
Bachelorarbeit

Frau
Michelle Naumann

**Einführung von Zellkulturstimu-
lanzen zur Verbesserung der Di-
agnostik bei chronischer lymph-
tischer Leukämie**

Mittweida, 2016

BACHELORARBEIT

Einführung von Zellkulturstimu- lanzen zur Verbesserung der Di- agnostik bei chronischer lymph- tischer Leukämie

Autor:
Frau

Michelle Naumann

Studiengang:
Biotechnologie/ Bioinformatik

Seminargruppe:
Bi13w1-b

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. habil.

Röbbe Wünschiers

Zweitprüfer:
Dipl.–Biol. Sonja Schweinsberg

Einreichung:
Mittweida, 25.09.2016

Bibliographische Beschreibung:

Naumann, Michelle:

Einführung von Zellkulturstimulanzien zur Verbesserung der Diagnostik bei chronischer lymphatischer Leukämie. 2016. 5 Verzeichnisseiten, 45 Seiten Inhalt, 17 Seiten Anhang, Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2016

Englischer Titel

“Introduction of cell culture stimulants to improve the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia”

Kurzbeschreibung:

Diese Bachelorarbeit beschäftigt sich mit der Einführung von Zellkulturstimulanzien zur Verbesserung der Diagnostik bei chronisch lymphatischer Leukämie. Es wurde sich dabei auf die erfolgreiche Kultivierung der betroffenen Zellen konzentriert.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Ein Wort für viele Formen : Krebs	2
1.2 Chronisch lymphatische Leukämie.....	2
1.2.1 Entstehung der chronisch lymphatischen Leukämie	3
1.2.2 Zytogenetik der chronisch lymphatischen Leukämie	7
1.2.3 Krankheitsbild und Verlauf der chronisch lymphatischen Leukämie	12
1.2.4 Therapiemöglichkeiten und Behandlung chronisch lymphatischer Leukämie	14
1.3 Einsatz der Zellkulturstimulanzen DSP30 und IL-2.....	19
2 Zielstellung	21
3 Material.....	22
3.1 Chemikalien	22
3.2 Medien	22
3.3 Molekularbiologische Reagenzien.....	22
3.4 Material.....	22
3.5 Geräte.....	22
4 Methoden	23
4.1 Durchführungsbestimmungen für BCLL-Proben	23
4.1.1 Probeneingang und Ansatz	23
4.1.2 Präparation	25
4.1.3 Auftropfen.....	25
4.1.4 Bänderung.....	26
4.2 Auswertung mittels Metaphasensuchers und Ikarus-Software.....	27
5 Ergebnisse.....	29
6 Diskussion	37
6.1 Allgemeine Diskussion über die erreichten Ergebnisse	37

6.2 Diskussion über die Durchführung der Experimente	38
6.3 Stimulation der B-Zellen durch DSP30 in Kombination mit IL-2	40
7 Ausblick	44
8 Zusammenfassung	45
Literaturverzeichnis	46
Anhang.....	52
Selbstständigkeitserklärung.....	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: : Schematische Darstellung des zellulären Ursprungs B-lymphatischer Neoplasien in Lymphknoten und ihre entsprechende Benennung (Fuchs, 2013).

Abbildung 2: Betroffene Zellen bei einer chronisch lymphatischen Leukämie (URL 5)

Abbildung 3: BCLL-Ausstrich mit starker Lymphozytose und Gumprecht-Kernschatten (URL 6)

Abbildung 4: Arbeitsplatz mit Kultur und zusätzlich benötigten Materialien für die BCLL.

Abbildung 5: CLL-Zusatz FKS im Vordergrund, verwendetes Medium und Stimulanzen im Hintergrund.

Abbildung 6: Auftropflabor mit Probenröhrchen und Objektträgern.

Abbildung 7: Aufbau für die Bänderung der Objektträger.

Abbildung 8: Aufbau des Methapasensuchers mit Tower (Links), Greifarm (rechts neben Tower), Lichtmikroskop (Mitte) und Computer (rechts)

Abbildung 9: vollständiges Karyogramm ohne Aberrationen; günstiger Faktor

Abbildung 10: Karyogramm mit Aberration +del(12q); ungünstiger Faktor

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilungsstadien der CLL nach Binet
Tabelle 2:	Übersicht der untersuchten Proben
Tabelle 3:	nachgewiesene Chromosomenaberrationen 1
Tabelle 4:	nachgewiesene Chromosomenaberrationen 2

Abkürzungsverzeichnis

BCLL	chronisch lymphatische Leukämie der B-Zellen
CBA	Chromosomenbänderungsanalysen
CD38	cyclic ADP ribose Hydrolyse
cGy	Zentigray
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
FBS	Fetales Rinderserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Gy	Energiedosis Gray Joule/Kilogramm
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IgHV	Ig heavy Chain V-III
KCL	Kaliumchlorid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
Th	Thymidin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
ZAP70	zeta-associated-protein

1 Einleitung

Die mikroskopische Beobachtung von zellulären Bestandteilen des Erbgutes steht im Mittelpunkt der Zytogenetik, einem Teilbereich der Genetik. Insbesondere wird sich hierbei auf die Untersuchung und Betrachtung der Chromosomen in der Zelle konzentriert. Die Anzahl, Gestalt, Struktur und vor allem die strukturellen Anomalien der Chromosomen werden mithilfe des Verfahrens der Lichtmikroskopie beobachtet um die möglichen Auswirkungen auf den Organismus beurteilen zu können (URL 1).

Bereits 1914 wurde von dem Biologen Theodor Boveri ein Zusammenhang zwischen der Entstehung maligner¹ Tumore und chromosomalen Veränderungen vermutet (Boveri, 1914). Jedoch konnte diese Vermutung erst Jahre später mithilfe der dazu erforderlichen technischen Voraussetzungen bestätigt werden. Für die Diagnose und Prognoseabschätzung sowie die Wahl von Therapien ist heutzutage die Kenntnis über chromosomale Veränderungen unverzichtbar (Harder et al., 1998). Die chronisch lymphatische Leukämie gehört mit einem Anteil von 7% zu den häufigsten malignen Tumoren und ist in Europa und den USA die häufigste Leukämieform älterer Menschen (Vroblová et al., 2009).

Die Entfaltung und der Verlauf einer chronisch lymphatischen Leukämie sind äußerst heterogen. Teilweise treten Tumore auf, die sehr langsam wachsen und es somit kaum zur Einschränkung der Lebenserwartung kommt. Andererseits treten auch sehr aggressive Tumore auf, die durch Behandlung mit Medikamenten kaum beeinflussbar sind und innerhalb kürzester Zeit nach der Diagnose zum Tode führen können (Rozman und Montserrat, 1995; Vroblová et al., 2009). Die chronisch lymphatische Leukämie gehört jedoch trotzdem zu den indolenten, also zu den weniger aggressiv fortschreitenden, Lymphomen.

¹ Maligne (bösartige) Tumore durchdringen das umgebene Gewebe und streuen in den Körper. (URL 12)

1.1 Ein Wort für viele Formen : Krebs

Eine Menge Erkrankungen, mit verschiedenen Krankheitsverläufen- und Symptomen, werden unter dem Oberbegriff Krebs zusammengefasst. Der Begriff ist mit Angst behaftet wie kaum ein anderer. Jedoch verfügt die Medizin heute über Behandlungsmethoden die in der Lage sind Krebserkrankungen zurückzudrängen und den Patienten über Jahre hinweg ein meist beschwerdefreies Leben zu ermöglichen. Dies ist natürlich abhängig von der Krebsart und dem Stadium der Erkrankung (Fuchs, 2013).

Wenn sich Körperzellen unkontrolliert vermehren und nicht Absterben sprechen die Mediziner von Krebs. Zwischen dem Absterben von Zellen und der Neubildung durch Zellteilung besteht unter den Tausenden von Milliarden von Zellen im Organismus normalerweise ein Gleichgewicht. Wenn es durch Mutationen zur Veränderung der Zellen im Erbgut kommt und sich diese Mutationen häufen, kann es zur unkontrollierten Vermehrung der mutierten Zellen führen. Nach einer gewissen Zeit setzt bei gesunden Zellen der programmierte Zelltod ein und die Zellen sterben ab. Dies gilt jedoch nicht für die mutierten Zellen. Sie sterben nicht ab, sondern vermehren sich ständig weiter und nehmen in ihrer Anzahl zu. Durch diese unkontrollierte Vermehrung gerät das Gleichgewicht zwischen Zellteilung und neu entstandenem Gewebe außer Kontrolle und es kommt zur Entstehung von Tumoren (URL 2).

1.2 Chronisch lymphatische Leukämie

Die chronisch lymphatische Leukämie gilt als häufigste Leukämieform des Erwachsenenalters in den westlichen Ländern. Sie deckt ein Drittel aller Fälle ab und beginnt meist sehr schleichend. Ihr Verlauf dauert über Monate oder mehrere Jahre an und bleibt oft lange Zeit unbemerkt. In Deutschland erkranken jährlich statistisch gesehen etwa drei von 100.000 Menschen wobei meist Männer und Frauen im höheren Alter betroffen sind. Das Risiko an einer chronisch lymphatischen Leukämie zu erkranken steigt mit dem Alter deutlich an und ist für Männer ungefähr doppelt so hoch wie für Frauen (URL 3).

Wenn es zu einer unkontrollierten, bösartigen Zunahme weißer Blutkörperchen kommt spricht man von Leukämie. Das bedeutet, dass eine Blutkrebserkrankung vorliegt. Im

Fälle der Vermehrung der B-Lymphozyten, einer Untergruppe der weißen Blutkörperchen, handelt es sich um eine chronisch lymphatische Leukämie der B-Zellen (BCLL). In Folge eines Defektes leben die mutierten und veränderten B-Zellen deutlich länger als gesunde Lymphozyten und beeinflussen und überschwemmen somit die intakten Zellen in den betroffenen Organen. Besonders betroffen sind hierbei Lymphknoten, Knochenmark, Blut und Milz. Es gibt viele diagnostische Kriterien durch die eine Leukämie bestimmt werden kann. Laut Definition liegt jedoch eine Erkrankung vor, wenn die Anzahl der mutierten B-Zellen im Blut 5000 pro Mikroliter übersteigt.

Meist verläuft eine chronisch lymphatische Leukämie über Jahre hinweg schleichend und beschwerdefrei bis sie diagnostiziert wird. Und auch nach der Diagnose gelingt es durch neue Therapiemöglichkeiten das Leben der Patienten oft jahrelang ohne größere Beschwerden zu gestalten. In den letzten Jahren wurden durch neue Konzepte der Therapie wesentliche Fortschritte in der Behandlung der Betroffenen erzielt (URL 2, URL 3).

1.2.1 Entstehung der chronisch lymphatischen Leukämie

Die Entstehung einer chronisch lymphatischen Leukämie (oder auch kleinzelliges lymphozytisches Lymphom) beruht auf der klonalen Expansion maligner B-Lymphozyten (95% der Fälle) und T-Lymphozyten (5% der Fälle) (Fuchs, 2013). Die mutierten Zellen befinden sich in einem frühen Entwicklungsstadium, erscheinen jedoch morphologisch reif. Diese immuninkompetenten B-Lymphozyten vermehren sich konsekutiv in Knochenmark, Lymphknoten, Milz und Blut.

Die chronisch lymphatische Leukämie ist jedoch die einzige Form der Leukämie deren Entstehungsursprung nicht das Knochenmark darstellt. Aufgrund dieser Besonderheit wird die CLL als Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) klassifiziert. Sie wird auch als leukämisch verlaufendes B-Zell-Lymphom von niedrigem Malignitätsgrad, welches in das Knochenmark metastasiert, bezeichnet (Fuchs, 2013).

Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen handelt es sich um maligne klonale Neoplasien des lymphatischen Gewebes. Die Abkürzung NHL dient als Oberbegriff, wobei die malignen Lymphome in einer heterogenen Untergruppe zusammengefasst werden. Diese

Untergruppe beschäftigt sich mit NHL, die häufiger von den B-Zellen und seltener von T-Zellen oder NK-Zellen (natürlichen Killerzellen) ausgehen. Die Entstehung der malignen Klone erfolgt in den verschiedenen Bestandteilen des Lymphknotens. Die schematische Darstellung des zellulären Ursprungs B-lymphatischer Neoplasien im Lymphknoten und deren entsprechende Benennung sind in der Abbildung 1 dargestellt (Fuchs, 2013)

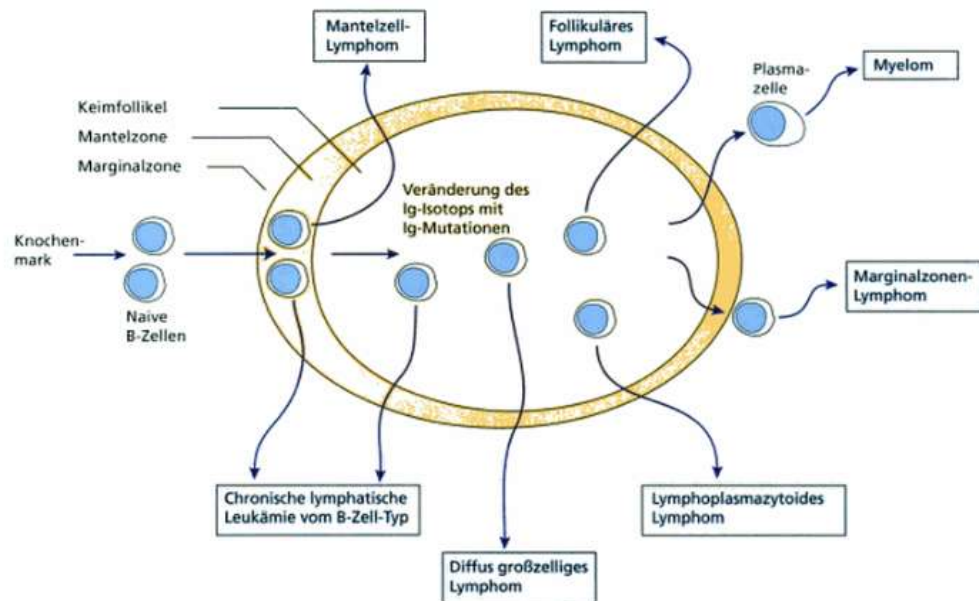


Abbildung 1 : Schematische Darstellung des zellulären Ursprungs B-lymphatischer Neoplasien in Lymphknoten und ihre entsprechende Benennung (Fuchs, 2013).

Das Risiko für die Entstehung einer chronisch lymphatischen Leukämie hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Einerseits kann die Krankheit vererbt worden sein. Menschen die unter ihren Angehörigen betroffene Personen haben, haben ein erhöhtes Risiko an einer CLL oder einem anderen Lymphom zu erkranken. Andererseits kann die Krankheit erworben sein, wenn zum Beispiel Kontakt zu organischen Lösungsmitteln wie Benzol besteht.

Monoklonale B-Lymphozyten vermehren sich langsam ohne, dass der Patient es spürt. Diese Phase der Vermehrung geht der CLL voraus und wird als Monoklonale B Lymphozytose (MBL) bezeichnet, da die B Lymphozyten aussehen wie Leukämiezellen. Diese Monoklonale B Lymphozytose ist bei mehr als 5% aller über 60 jährigen Men-

schen nachweisbar, wobei das Risiko für einen Übergang in eine CLL die behandlungsbedürftig ist bei 1% pro Jahr liegt (URL 4).

Die BCLL entsteht durch die uneingeschränkte Vermehrung der mutierten B Lymphozyten, die das Gleichgewicht zwischen der Neubildung und dem Zelltod der Zellen stören. Abbildung 2 und 3 zeigen die betroffenen Zellen und das charakteristische Aussehen der mutierten Zellen. Es herrscht eine Lymphozytose, was bedeutet, dass eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten zu sehen ist. Des Weiteren sieht man vermehrt Gumprecht-Kernschatten, bei der Kultivierung und Präparation zerstörte Zellen, die jedoch bei einer CLL deutlich häufiger zu sehen sind als bei gesunden Patienten, da die Lymphozyten durch die Erkrankung instabil werden.

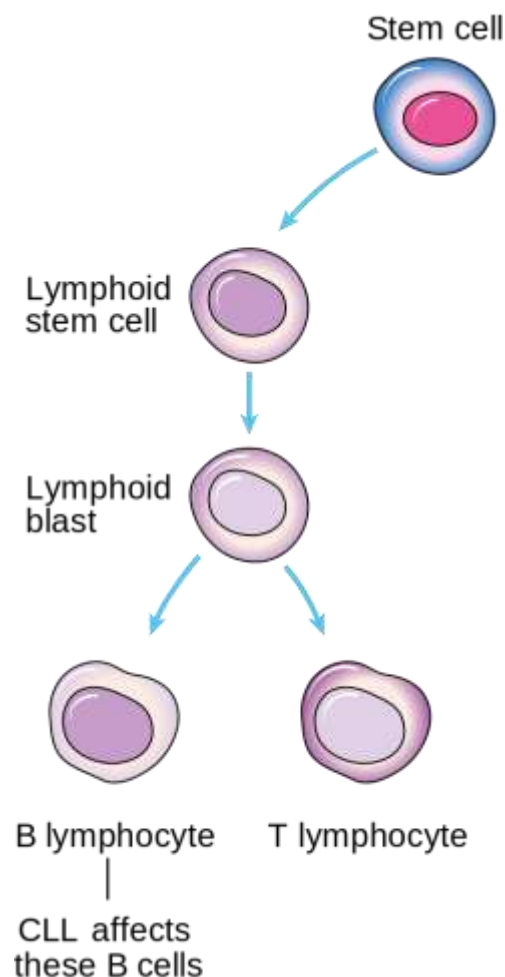


Abbildung 2: Betroffene Zellen bei einer chronisch lymphatischen Leukämie (URL 5)

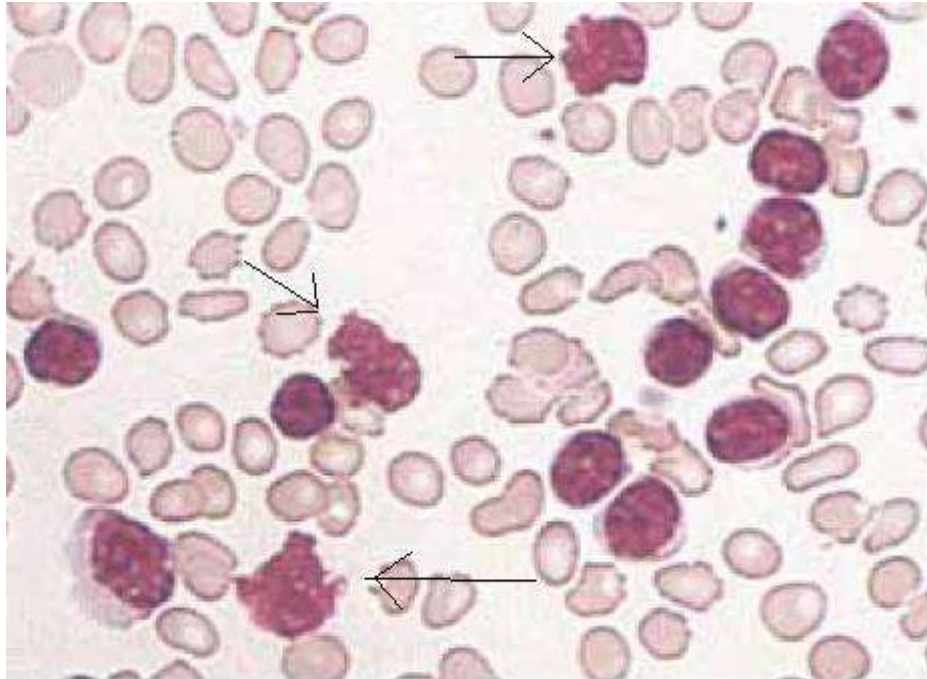


Abbildung 3: BCLL-Ausstrich mit starker Lymphozytose und Gumprecht-Kernschatten ²(URL 6)

Die veränderten Zellen überschwemmen die Betroffenen Gewebe von Lymphknoten, Milz, Leber und Knochenmark und es kommt im schlimmsten Fall zu Bildung von Tumoren. Die Entstehung dieser Krankheit bleibt jedoch oft unbemerkt und kommt meist erst durch Blutuntersuchungen zum Vorschein bei denen die Werte auffällig sind (Fuchs, 2013).

Für die eindeutige Diagnose einer chronisch lymphatischen Leukämie müssen bestimmte Krankheitszeichen und Kriterien erfüllt sein. Es müssen sich zum einen mehr als 5000 Lymphozyten pro Mikroliter befinden und somit eine erhöhte Lymphozytenanzahl vorhanden sein. Des Weiteren müssen die Zellen ein für die CLL typisches Muster an Eiweißen an ihrer Oberfläche tragen und es findet eine Leichtkettenrestriktion statt. Dies bedeutet, dass nur eine Art von zwei möglichen leichten Ketten von Antikörpern durch die mutierten B-Lymphozyten hergestellt wird. Nachdem die Diagnose gestellt wurde dauert es oft noch Jahre bis eine Behandlung eingeleitet werden muss (URL 3).

² Gumprecht Kernschatten entstehen durch erhöhte Vulnerabilität der Leukozyten während des Präparationsprozesses (URL 13).

1.2.2 Zytogenetik der chronisch lymphatischen Leukämie

Um bei einer chronisch lymphatischen Leukämie prognostisch relevante Aberrationen der Chromosomen nachweisen zu können wird oft eine Kombination aus der herkömmlichen Chromosomenanalyse und der FISH-Analyse angewendet. Es gibt für die Prognose günstige und ungünstige Aberrationen. Stückverluste des langen Arms von Chromosom 13 signalisieren einen besseren Krankheitsverlauf, wobei der Verlust von p53, was eine Deletion in 17p13 bedeutet, ebenso wie die Deletion des langen Arms des Chromosomen 11, eine ungünstige Prognose bedeutet (Zenz et al., 2010). Die zytogenetische Analyse der Chromosomen dient bei einer chronisch lymphatischen Leukämie nicht zur Diagnosestellung, sondern zur Prognoseabschätzung (Zenz et al., 2010). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben somit therapeutische Konsequenzen, da es abhängig von der Art der Aberrationen ist, auf welche Medikamente und Behandlungen Patienten ansprechen. Patienten sprechen zum Beispiel nicht auf die Behandlung mit Purinanaloga an, wenn sie eine p53-Aberration besitzen, wobei 56% der Patienten, die keine p53-Aberration vorweisen, auf dieselbe Behandlung mit einer Remission reagieren.

11q-Deletionen führen nach umfangreichen Studien zufolge bei jüngeren CLL-Patienten zu einer signifikanten Verkürzung der Lebenszeit. Diese Patienten können daher Kandidaten für moderne Strategien der Therapie darstellen (URL 7).

Heutzutage gehört die Analyse der Chromosomen bei der Diagnose leukämischer Erkrankungen zu den obligatorischen Untersuchungsmethoden. Hierbei tragen die Ergebnisse nicht nur zur Absicherung einer Diagnose bei, sondern besitzen eine entscheidende prognostische Bedeutung. Diese geht aus dem ermittelten Karyotyp, welcher aus den leukämischen Zellen abgeleitet werden kann, hervor. Die mit der Leukämie assoziierten Chromosomenaberrationen begrenzen sich auf die Leukämiezellen, bei denen es sich um erworbene genetische Veränderungen handelt. Die restlichen Zellen im Körper eines an Leukämie erkrankten Patienten verhalten sich zytogenetisch unauffällig (Zytogenetische Analyse KM).

Methoden und Untersuchungsmaterial

Es stehen verschiedene Methoden für die genetische Charakterisierung von Leukämien zur Verfügung. Einen Gesamtüberblick über alle mikroskopisch erkennbaren chromosomalen Veränderungen bietet die konventionelle Chromosomenanalyse. Durch weitere Techniken, wie der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung oder molekulargenetischen Anwendungen wie der Southern-Blot oder der Polymerase-Kettenreaktion, können auch submikroskopische Abweichungen nachgewiesen werden. Für die zuletzt genannten Methoden ist es jedoch notwendig, dass die Veränderung die nachgewiesen werden soll bereits bekannt ist, sodass entsprechende Primär bzw. Sonden für den Nachweis zur Verfügung stehen.

Das Untersuchungsmaterial für die Chromosomenanalyse stellt 5 bis 10ml mit Heparin antikoagulierte Knochenmark dar. Die zytogenetische Untersuchung kann auch aus dem peripheren Blut erfolgen, jedoch nur wenn kein Knochenmark gewonnen werden kann. Die entnommenen Proben müssen innerhalb von 24h in einem zytogenetischen Labor eintreffen, da für die Metaphasen-Zytogenetik vitale Zellen erforderlich sind. Dabei ist es wichtig, dass die Zellen nicht tiefgefroren werden (Zytogenetische Analyse KM).

Konventionelle Chromosomenanalyse durch Bänderungstechniken

Für die erfolgreiche Analyse von Chromosomen durch die konventionelle Chromosomenanalyse werden 20 bis 25 ausgewertete Metaphasen von guter Qualität benötigt. Die Zellen des Knochenmarks werden hierbei nach kurzzeitiger Kultivierung (24 bis 72h) oder direkt nach der Entnahme durch die Zugabe von Colcemid in der Metaphase arretiert. Die Metaphase-Ausbeute kann durch die Zugabe von Zytokinen zur Stimulation der Leukämiezellen während der Kultivierung gesteigert werden. Durch die Zugabe einer hypotonen Kaliumchloridlösung werden die Zellen zum Auffüllen gebracht und durch die Behandlung mit einer Methanol/Eisessig-Lösung (Fixativ) in mehreren Schritten fixiert. Die Zellsuspension wird anschließend auf Objektträger aufgetropft und zur

Identifikation der einzelnen Chromosomen anschließend gebändert. Hierbei gibt es verschiedene Bandentechniken:

- die G-(Giemsa-)
- die Q-(Quinacrin-) und
- die R-(reverse) Bandentechnik.

Durch diese Bandentechniken entstehen auf den Chromosomen helle und dunkle Banden, die für jedes Chromosom spezifisch sind und somit die eindeutige Identifizierung jedes der einzelnen Chromosomen ermöglichen. Um einen verlässlichen Befund zu erhalten wurde international festgelegt, dass 20 bis 25 Metaphasen vollständig analysiert werden müssen (Zytogenetische Analyse KM).

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung werden DNA-Sonden hybridisiert um spezifische chromosomale Strukturen zu identifizieren. Die Sonden werden verwendet, um entweder das ganze Chromosom, Gene auf dem Chromosom oder nur die Zentromer-Region einzelner Chromosomen zu markieren. Die beiden Doppelstränge der DNA-Helix von der DNA der eingesetzten Sonde, sowie die zu untersuchende Patienten-DNA, werden denaturiert. Die DNA-Sonden lagern sich bei der anschließenden Renaturierung (Hybridisierung) an die Patienten-DNA, welche als komplementärer Abschnitt vorliegt.

Die verwendeten DNA-Sonden werden mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern nachgewiesen oder sie sind direkt mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt. Die Fluoreszenz-Signale dienen nun dazu die entsprechenden Chromosomenstrukturen auszuwerten.

Diese Methode hat den Vorteil, dass sie neben der Durchführung an Metaphasen auch an Interphase-Kernen durchgeführt werden kann. Jedoch erhält man bei der Anwendung nur Informationen über die Chromosomen/ Gene, für die die Sonden eingesetzt wurden (Zytogenetische Analyse KM).

Interphase-FISH

Durch die Durchführung von FISH an Interphase-Kernen wird nur ein Bruchteil der Vielzahl verschiedener Chromosomenaberrationen, die bei Leukämien beobachtet werden, erfasst. Somit kann die klassische Chromosomenanalyse nicht ersetzt werden. Wird jedoch nur nach einer bestimmten Veränderung der Chromosomen gesucht, stellt die FISH-Technik eine schnelle und zuverlässige Methode dar. Außerdem liegt das Ergebnis nach schon 4 Stunden vor.

Die FISH-Technik kann für Verlaufskontrollen als Methode zum Nachweis von Resterkrankungen genutzt werden, wenn bei der Erstdiagnose mittels Chromosomenanalyse eine chromosomale Veränderung festgestellt wurde und für deren Nachweis eine entsprechende FISH-Sonde zur Verfügung steht (Zytogenetische Analyse KM).

Metaphase-FISH

An Metaphasen können, zusätzlich zu den an Interphase-Kernen einsetzbaren Sonden, sogenannte Chromosomen-Painting-Sonden verwendet werden. Diese Sonden markieren die gesamte DNA eines Chromosoms. Eingesetzt wird diese Technik zusätzlich zur konventionellen Chromosomenanalyse um Befunde bei schwierigen Fällen zu bestätigen (Zytogenetische Analyse KM).

24-Farben-FISH

Durch diese neue Methode ist es möglich in einer einzigen Hybridisierung alle 24 verschiedenen Chromosomenpaare darzustellen. Sie dient zur Identifizierung von komplizierten Aberrationen in der Struktur der Chromosomen und kann ausschließlich an Metaphase-Chromosomen durchgeführt werden (Zytogenetische Analyse KM).

Nomenklatur

Die Klassifizierung von Chromosomen erfolgt nach ihrer Größe, ihren charakteristischen Bandenmustern und der Lage des Zentromers (das Zentromer trennt die beiden Chromosomenarme). Jedes Chromosom besitzt einen langen (q) und einen kurzen (p) Arm. Durch das spezifische Bandenmuster wird jedes Chromosom in Banden und Regionen unterteilt, welche von Zentromer bis Telomer nummeriert werden. Das ISCN ist das international gültige zytogenetische Nomenklatursystem durch welches die strukturellen und numerischen Aberrationen exakt in einer Karyotyp-Formel beschrieben werden können. Zuerst wird die Anzahl der Chromosomen in der Formel genannt, danach werden die Geschlechtschromosomen angegeben. Der normale männliche Karyotyp lautet 46,XY, der normale weibliche Karyotyp 46,XX.

Numerische Chromosomenaberrationen werden Monosomien (Verlust eines Chromosoms) oder Trisomien (Zugewinn eines Chromosoms) genannt. Es können jedoch auch Vervielfältigungen des gesamten Chromosomensatzes entstehen. Der normale Chromosomensatz wird diploid (zweifach) genannt. Liegen die Chromosomen dreifach oder vierfach vor, spricht man von Triploidie bzw. Tetraploidie (Zytogenetische Analyse KM).

Zu den häufigsten strukturellen Chromosomenaberrationen gehören:

- Translokationen (zwischen verschiedenen Chromosomen kommt es zum Austausch von Chromosomenabschnitten)
- Deletion (Chromosomenteilverluste)
- Inversion (hierbei drehen sich Chromosomenabschnitte um 180°)
- Isochromosomen (Chromosom besteht aus zwei langen bzw. zwei kurzen Armen, Verlust des jeweils anderen Armes)

Der Zugewinn eines Chromosoms wird in der Karyotyp-Formel mit +, der Verlust eines Chromosoms mit – gekennzeichnet. Eine Trisomie des Chromosoms 12 würde sich in der Formel z.B. wie folgt äußern: 46,XX,+12. Eine Monosomie des Chromosoms 7 z.B. so: 46,XY,-7.

Ein t steht für Translokation und inv für Inversion. Diese Abkürzungen werden für die strukturellen Veränderungen der Chromosomen verwendet.

Chromosomenaberrationen werden als klonal bezeichnet, wenn der Verlust oder Zugewinn einer identischen Strukturaberration eines Chromosoms in mindestens drei bzw. in mindestens zwei Metaphasen beobachtet wird. Man unterscheidet zwischen sogenannten primären und sekundären Chromosomenaberrationen. Die primären Chromosomenaberrationen führen meist zu spezifischen Gen-Rearrangements und sind entscheidend für die Entstehung von Leukämien. Sekundäre Chromosomenaberrationen sind die Ursache für genomische Inbalancen und scheinen für die Progression einer Leukämie von Bedeutung zu sein (Zytogenetische Analyse KM).

1.2.3 Krankheitsbild und Verlauf der chronisch lymphatischen Leukämie

Die Vermehrung der B Lymphozyten im Blut wird meist zufällig bei den Untersuchungen im Blutbild festgestellt und ist typisch für die chronisch lymphatische Leukämie. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Vergrößerung von Milz, Lymphknoten und Leber. Weitere Symptome können durch die Verdrängung gesunder Zellen durch CLL Zellen im Knochenmark erklärt werden. Dieses Verhalten der mutierten Zellen führt zu einem erhöhten Infektionsrisiko, zur vermehrten Blutungsneigung und Blutarmut (Anämie)(URL 2, URL 4).

Autoimmunphänomene sind Reaktionen des Immunsystems gegen den eigenen Körper und stellen die Besonderheit der chronisch lymphatischen Leukämie dar. Diese Fehlreaktionen führen bei einer CLL zur Zerstörung und somit Verminderung von Blutplättchen, roten Blutkörperchen oder auch anderen Körperzellen. Dies äußert sich durch Beschwerden wie Fieber, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust. Die Symptome werden auch als B-Symptome bezeichnet, da sie charakteristisch für die chronisch lymphatische Leukämie sind.

Wie bereits beschrieben kann eine CLL jahrelang beschwerdefrei verlaufen oder auch nach wenigen Jahren oder zum Zeitpunkt der Diagnose eine Behandlung mit entspre-

chender Therapie erfordern. Die Krankheit kann also sehr unterschiedlich verlaufen und wird deshalb zur einheitlichen Erfassung in Stadien eingeteilt. Vor allem die Klassifikation nach Binet und Rai werden weltweit verwendet, wobei in Europa die Einteilung nach Binet gebräuchlicher ist. Diese Einteilung ist in Tabelle 1 dargestellt. Bestimmte Blutwerte und Gebiete des Befalls durch die Erkrankung sind für die Stadieneinteilung von großer Bedeutung (URL 2, URL 4).

Tabelle 1 : Einteilungsstadien der CLL nach Binet (URL 5)

Stadium	Beschreibung	Medianes Überleben
A niedriges Risiko	Weniger als drei befallene Lymphknotengebiete, Hämoglobin mindestens 10 Gramm pro Deziliter (g/dl) und Blutplättchen mindestens 100.000 pro Mikroliter (μ l)	>10 Jahre
B mittleres Risiko	Drei oder mehr befallene Lymphknotengebiete, Hämoglobin mindestens 10 g/dl und Blutplättchen mindestens 100.000 pro μ l	5 Jahre
C hohes Risiko	Hämoglobin niedriger als 10 g/dl oder Blutplättchen unter 100.000 pro μ l, unabhängig von der Anzahl der befallenen Lymphknotengebiete	2-3 Jahre

Für den Verlauf einer CLL gibt es prognostisch positive und negative Parameter, die die Prognose beeinflussen. Für einen ungünstigen Verlauf sprechen verschiedene Eigenschaften und Werte. Beispiele hierfür sind eine Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als 12 Monate, eine erhöhte Serumthymidinkinase, ein komplexer Karyotyp, schlechter Allgemeinzustand des Patienten, erhöhte Serumlaktatdehydrogenase, die Expression der Antikörper CD38⁺ und ZAP70⁺, das nicht Ansprechen auf Alkylantien oder Purinanaloga sowie zytogenetische Aberrationen del(17p) und del(11q). Wenn diese Parameter erfüllt werden liegt die durchschnittliche Überlebenszeit bei weniger als 10 Jahren. Die durchschnittliche Überlebenszeit bei positiven prognostischen Faktoren beträgt über 25 Jahre. Diese Parameter sind unter anderem die Expression der Antikörper CD38⁻ und ZAP70⁻, ein mutierten IgHV-Status sowie ein normaler Karyotyp oder eine Deletion (13q) (Michl et al., 2005).

1.2.4 Therapiemöglichkeiten und Behandlung chronisch lymphatischer Leukämie

Dank moderner Medikamente und medizinischem Fortschritts haben sich in den letzten Jahren die Möglichkeiten der Therapie bei chronischer lymphatischer Leukämie erheblich verbessert. Die Art der Behandlung wird je nachdem gewählt in welcher körperlichen Verfassung und Phase der Erkrankung der Patient sich befindet.

Da meist in den ersten Jahren der Erkrankung bei den Betroffenen keine Beschwerden auftreten genügen zunächst regelmäßige Arztbesuche die zur Kontrolle dienen. Die Behandlung wird bei Patienten, die sich in Stadium C befindenden, nach Möglichkeit unverzüglich begonnen. Es ist bei Patienten, die vorerst nicht behandelt werden müssen, sehr wichtig die Erkrankung regelmäßig durch Untersuchungen überwachen zu lassen. Die Vorgehensweise wird meist als "Beobachten und Abwarten" ("watch & wait") bezeichnet (URL 8).

Wenn der Zeitpunkt erreicht ist an dem die chronisch lymphatische Leukämie aktiv behandelt werden muss, erfolgt dies meist auf medikamentöser Basis. Es wird oft eine Kombination aus verschiedenen Therapien angewendet, da die Erfolgsrate dabei erhöht wird. Oft kommt die Chemotherapie in Kombination mit der Antikörpertherapie zum Einsatz. Diese beiden Therapieformen können als weitere Behandlungstherapie auch einzeln angewendet werden, was jedoch nicht oft vorkommt. Ebenso können Signaltransduktions-Inhibitoren eingesetzt oder eine Stammzelltransplantation durchgeführt werden (URL 8).

Chemotherapie

Bei der Behandlung einer CLL durch Chemotherapie werden verschiedene Stoffe und Stoffkombinationen eingesetzt um möglichst lang anhaltende und komplette Remissionen zu erzielen. Diese werden nachfolgend vorgestellt.

Chlorambucil

Vor allem für die Therapie älterer Patienten hat sich die Behandlung mit der Substanz Chlorambucil, welche ein Alkylans ist, durchgesetzt. Die Einnahme erfolgt oral und ist

somit leicht zu handhaben. Die Dosierung folgt zwei unterschiedlichen Schemata. Es gibt hierbei die kontinuierliche und diskontinuierliche Dosierung des Mittels. Die Dosis von Chlorambucil wird in Kilogramm pro Idealkörpergewicht angegeben. Bei der Verteilung des Stoffes im Körper sind die Fettgewebe nicht betroffen. Bei der kontinuierlichen Behandlung werden täglich 0,08 mg/kg eingenommen. Die Tagesdosis sollte jedoch auch nach Steigerung der Dosis 15mg/kg pro Tag nicht überschreiten. Bei diskontinuierlicher Gabe werden alle 2 Wochen 0,4 mg/kg an einem Tag eingenommen, wobei hier die Dosis an einem Tag alle 14 Tage um 0,1 mg/kg gesteigert jedoch nicht 0,8 mg/kg alle vierzehn Tage überschreiten darf. Auch wenn myelotoxische Nebenwirkungen auftreten darf die Dosis nicht weiter gesteigert werden. Bis zum maximalen Ansprechen der Chlorambucil-Therapie können in der Regel mehrere Wochen bis Monate vergehen. Die Remissionsrate bei vorher unbehandelten Patienten liegt zwischen 30 und 70%, wobei sie meist nicht lang anhalten oder unvollständig sind (Sawitsky et al., 1977)

Cyclophosphamid

Wenn eine Chlorambucil-Unverträglichkeit festgestellt wird, kann auf ein weiteres Alkylans, Cyclophosphamid, zurückgegriffen werden. Hierbei kann die Dosierung durch 1 bis 5mg/kg Körpergewicht täglich über den Zeitraum von 4 Wochen oder alle 10 bis 14 Tage durch die Gabe von 10 bis 15mg/kg Körpergewicht erfolgen (CLL trialists' collaborative Group et al., 1999, Han et al., 1973).

Fludarabin

Bei Fludarabin handelt es sich um ein Purinanalogon, welches in Bezug auf die CLL am besten untersucht ist und als Einzelsubstanz eingesetzt häufiger und länger anhaltende komplette Remissionen erzielt als die Monotherapie mit Alkylanzien. Gewöhnlich wird es intravenös alle 4 Wochen für 4 bis 6 Zyklen verabreicht. Dabei beträgt die Dosis 25 mg/m² Körperoberfläche. Bei vorbehandelten CLLs können Ansprechraten von 13 bis 67% (0 bis 37% komplette Remission) und bei nicht vorbehandelten CLL Ansprechraten von 70 bis 80% (23 bis 37% komplette Remission) erreicht werden (Diehl et al., 1998, Byrd et al., 1998).

In verschiedenen Studien zeigte sich zum einen, dass Fludarabin ein längeres krankheitsfreies Überleben und signifikant höhere Ansprechraten als Chlorambucil bewirkt und auch, dass die Monotherapie mit Fludarabin den Kombinationstherapien wie CAP (Cyclophosphamid, Adriamycin, Prednison) und CHOP (Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin, Prednison) in Bezug auf die Ansprechraten ebenbürtig ist (Leporrier et al., 1997, Johnson et al., 1996).

Durch die Kombination von Fludarabin mit anderen Zytostatika lässt sich die therapeutische Effizienz noch verbessern. Die Kombination von Fludarabin mit Cyclophosphamid (FC) stellt eine der wirksamsten Therapien dar und erzielte in Phase-II-Studien bei vorbehandelten Patienten Ansprechraten von über 80% (Hallek et al., 2008, O'Brien et al., 1995).

Ebenso hat die Kombinationstherapie aus Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron (FCM), welche in einer kleinen Phase-II-Studie untersucht wurde, eine gute Gesamtansprechrate (61%) und eine hohe Rate an kompletten Remissionen (44%) erzeugt. Jedoch wird diese Therapieform aufgrund von Nebenwirkungen noch durch das CLL-6-Protokoll geprüft (Bosch et al., 1997).

Neben Fludarabin stehen noch weitere Purinanaloga zur Verfügung welche jedoch zunächst noch in Studien auf ihre Ansprech- und Remissionsrate getestet werden müssen (Juliussen et al., 1990, Rondell et al., 1997).

Neben den oben aufgezeigten Monotherapien gibt es auch konventionelle Polychemotherapien die zum Einsatz kommen, wenn obige Einzeltherapien versagt haben. Dazu gehören neben der CAP- und der CHOP-Therapie auch die COP-(Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison) Kombination. Diese Polychemotherapien werden auch bei anderen niedrig-malignen Non-hodgkin-Lymphomen erfolgreich eingesetzt (Johnson et al., 1996, Leporrier et al., 1997).

Neue Substanzen

In den letzten Jahren wurde die Wirksamkeit von einer Reihe neuer Medikamente bei der CLL getestet. Das Spektrum der therapeutischen Optionen der CLL wird sich in den nächsten 5 Jahren, wie es zu erwarten ist, erheblich erweitern. Jedoch müssen auch diese neuen Medikamente zunächst durch kontrollierte Studien abgesichert werden bevor sie offiziell eingesetzt werden können (Hallek et al., 2008).

Strahlentherapie

Gelegentlich wird die Strahlentherapie zur Verkleinerung solitärer Lymphknotenpakete sowie bei symptomatischer Splenomegalie angewandt. Bei solitären Lymphomen erfolgt die Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 24 bis 30 Gy, bei Splenomegalie wird eine fraktionierte Bestrahlung von maximal 500cGy durchgeführt. Die Ganzkörperbestrahlung nimmt eine größere Rolle ein und wird in vielen Protokollen zur Konditionierung von Hochdosis-Chemotherapien eingesetzt (Hallek et al., 2008).

Splenektomie

Bei der Behandlung der CLL kommt es nur zu einer chirurgischen Maßnahme die eventuell ergriffen werden muss. Hierbei handelt es sich um eine Splenektomie. Vor allem wird sie bei einer autoimmunhämolytischen Anämie, einer Trombozytopenie oder beim Hypersplenismus angewandt (Hallek et al., 2008).

Hochdosistherapie und Transplantation hämatopoetischer Progenitorzellen

Die Durchführung von Hochdosis-Chemotherapien mit autologer oder allogener Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantationen stellen die möglicherweise ersten kurativen Ansätze zur Behandlung einer CLL dar. Durch allogene Transplantationen können hohe Remissionsrate erreicht werden (in 70% aller Fälle). Jedoch ist die therapieassozii-

ierte Mortalitätsrate zu hoch um diese Art der Therapie zu empfehlen. 46% der CLL Patienten starben im Gebiet der European Bone Marrow Transplantation Registry (EBMT) nach kurzer Zeit an einer akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion (Wasilenko et al., 1999, Michallet et al., 1996).

Im Vergleich dazu ist die autologe Stammzelltransplantation, vor allem die von peripheren Blutstammzellen, weniger toxisch. Die Therapiebedingten Todesfälle sind bei dieser Art der Transplantation sehr viel niedriger. Hierbei liegt das Problem jedoch bei der Verunreinigung des autologen Transplantats durch Leukämiezellen. Laufende klinische Studien beschäftigen sich mit den Schwachstellen dieser Therapien um die mögliche Heilung der CLL zu erreichen (Hallek et al., 2008).

Monoklonale Antikörper

Für die passive Immuntherapie bei der CLL werden der Anti-CD-20-Antikörper Rituximab und der Anti-CD52 Antikörper verwendet. Jedoch lassen sich Ansprechraten wie bei anderen Lymphomarten bei der CLL nicht reproduzieren. Bei der Behandlung der CLL zeigt der Anti-CD52-Antikörper eine höhere Effektivität und könnte zum in-vivo-Purging(Reinigung) bei Hochdosis-Chemotherapien oder für Erhaltungstherapien genutzt werden (Osterburg et al., 1997, Seymour et al., 1995).

Supportive Therapie

Die Lebensqualität von CLL Patienten kann durch supportive Maßnahmen wie das Austauschen von Blutprodukten verbessert werden. Jedoch ist die Wirksamkeit anderer Maßnahmen dieser Art noch nicht eindeutig durch randomisierte Studien belegt. Bei diesen weiteren Maßnahmen handelt es sich zum Beispiel um die Gabe von Erythropoetin zur Besserung einer Anämie, der Gabe von Wachstumsfaktoren (G-CSF) zur Verkürzung der neutropenen Phase nach einer Chemotherapie oder das Verabreichen von Immunglobulinen zur Verbesserung des häufig auftretenden Antikörpermangels sowie

die prophylaktische Behandlung mit Antibiotika oder Virostatika zur Verhinderung von Infektionen. (Annaissi et al., 1998, Molica et al., 1991, cooperative group et al., 1999)

1.3 Einsatz der Zellkulturstimulanzien DSP30 und IL-2

Das synthetisch hergestellte CpG-Oligonukleotid DSP30 ist ein kurzes DANN-Fragment welches aus 27 DNA-Bausteinen besteht. Es beinhaltet CpG-Dinukleotide (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Dinukleotide) die aus folgendem Muster bestehen: 5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC-3'.

Die Proliferation von B-Lymphozyten wird durch die unmethylierten CpG-Motive stimuliert, was dem Effekt ähnelt, wenn die B-Lymphozyten mit bakterieller DNA inkubiert werden (Laing et al., 1996; Decker et al., 2006). Im Gegensatz zur DNA der Prokaryoten liegen die 5'-CpG-3'-Motive im Mensch weitgehend methyliert vor. Die Herunterregulation von Genexpressionen ist unter dem Begriff Methylierung bekannt. DSP30 ist eine kurzkettige, synthetisch hergestellte Nukleinsäure, auch Antisense-Oligonukleotid genannt, welche eine, zu einer funktionalen mRNA, gegenläufige bzw. komplementäre Basenabfolge besitzt. Die Komplementarität bezieht sich in diesem Fall auf einen Teil des Bereiches der rev-Region welche sich innerhalb des Genomes des HI-Virus befindet.

Liang et al. zeigten in einer Studie die besonders hohe Effektivität dieses Oligonukleotidmusters von DSP30 als Stimulus für die Proliferation der normalen B-Lymphozyten als auch der CLL-Zellen (Liang et al., 1996). Die Interaktion zwischen dem CpG-Oligonukleotid und einem speziellen Oberflächenmolekül der Lymphozyten, dem Toll-like-Rezeptor-9, ist die Ursache hierfür. Bei dieser Interaktion wird eine Signalkaskade ausgelöst und die Zellen werden angeregt in die Mitose überzugehen (Krieg und Kline, 2000). Die Stimulation der CLL-Lymphozyten kann weiterhin gesteigert werden, wenn DSP30 mit dem wichtigen Zellbotenstoff IL-2 kombiniert angewendet wird (Decker et al., 2000; Decker et al., 2002). Da es an spezifischen Oberflächenrezeptoren mangelt ist der alleinige Einsatz von IL-2 und dessen Inkubation mit den B-Lymphozyten in Abwesenheit von Nukleotiden unnötig. Es kommt durch den alleinigen Einsatz von IL-2 nicht zur gewünschten Proliferation. Nur in Kombination mit DSP30 entsteht die proliferationsfördernde Wirkung, da es durch die CpG-Oligonukleotide zur

Expression hochaffiner Rezeptoren für IL-2 kommt (Liang et al., 1996, Decker et al., 2000).

2 Zielstellung

Das Ziel dieses Praxismoduls war die Einführung von Zellkulturstimulanzien zur Verbesserung der Diagnostik bei chronischer lymphatischer Leukämie sowie die Beobachtung und Bewertung dieser Anwendung. Die Proben wurden selbst aufbereitet, kultiviert, präpariert und anschließend ausgewertet. Ziel war es ebenfalls, herauszufinden, ob der Einsatz der Stimulanzien DSP30 in Kombination mit IL-2 für die Diagnostik der BCLL nötig und wenn ja erfolgreich ist.

3 Material

3.1 Chemikalien

Colcemid (Roche)
Kaliumchlorid
HBSS
Methanol
Essigsäure
Natriumchlorid
Kaliumdihydrogenphosphat 60mmol/l
Dinatriumhydrogenphosphat 60 mmol/l

3.2 Medien

RPMI-1640
MarrowMax

3.3 Molekularbiologische Reagenzien

FBS (Biochrom)
Thymidin
DSP30 (CpG-Oligonukleotid)
Interleukin-2
Trypsin
Giemsa

3.4 Material

Knochenmark oder peripheres Blut

3.5 Geräte

Zentrifuge
Heizplatte
Wasserbad
Brutschrank
Metaphasensucher

4 Methoden

Je nach Indikation werden die Zellen des peripheren Blutes oder Knochenmarks mit zusätzlichen Stimulanzen kultiviert und daraus anschließend Metaphasen-Chromosomen präpariert. Die folgenden Durchführungsbestimmungen wurden dem Dokument: Zytogenetische Analyse KM, Blut.doc der Zentrum für Diagnostik entnommen. Die verwendeten Aufnahmen im Abschnitt Methoden wurden selbst angefertigt.

4.1 Durchführungsbestimmungen für BCLL-Proben

4.1.1 Probeneingang und Ansatz

Nach Eingang der Proben werden diese aufbereitet. Dafür werden die Zellen des Knochenmarks oder peripheren Blutes zunächst in Zentrifugenröhrchen umgefüllt und für 10 min bei 22°C und 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mit einem sterilen Tropfen verworfen, die Zellsuspension vermischt und danach der gesamte restliche Inhalt aufgenommen und auf drei Kulturflaschen aufgeteilt. Die drei Kulturflaschen werden wie nachfolgend beschrieben: Nummer des Falls auf jede der Flaschen; 24h Th auf die erste Kulturflaschen; 48h Th auf die zweite Flasche; 72h Th auf die dritte Flasche. Jede der Flaschen erhält die Beschriftung: BCLL. Nachdem die Zellsuspension gleichmäßig auf die Kulturflaschen verteilt wurde, werden zwei verschiedene Medien hinzugegeben. Die erste Flasche (24h Th) erhält 6ml MarrowMax Medium, die beiden anderen Flaschen (48h Th und 72h Th) jeweils 5ml RPMI-Medium. Nachdem das Medium verteilt wurde, werden die Zusätze zugegeben. Der 24h- Thymidin Kultur werden 0,2ml Thymidin zugetropft bevor die Kulturflasche in den Brutschrank gelegt wird. Die beiden weiteren Kulturflaschen erhalten mehrere weitere Zusätze die nachfolgend aufgelistet werden:

- 0,2 ml Thymidin
- 28µl DSP30-Stammlösung
- 14µl IL-2 Stammlösung
- 1,4ml FBS

Abbildung 4 und 5 zeigen einen Teil der verwendeten Zusätze und Stimulanzen am Arbeitsplatz unter der Sterilwerkbank (Abbildung 4 und 5).



Abbildung 4: Arbeitsplatz mit Kultur und zusätzlich benötigten Materialien für die BCLL.

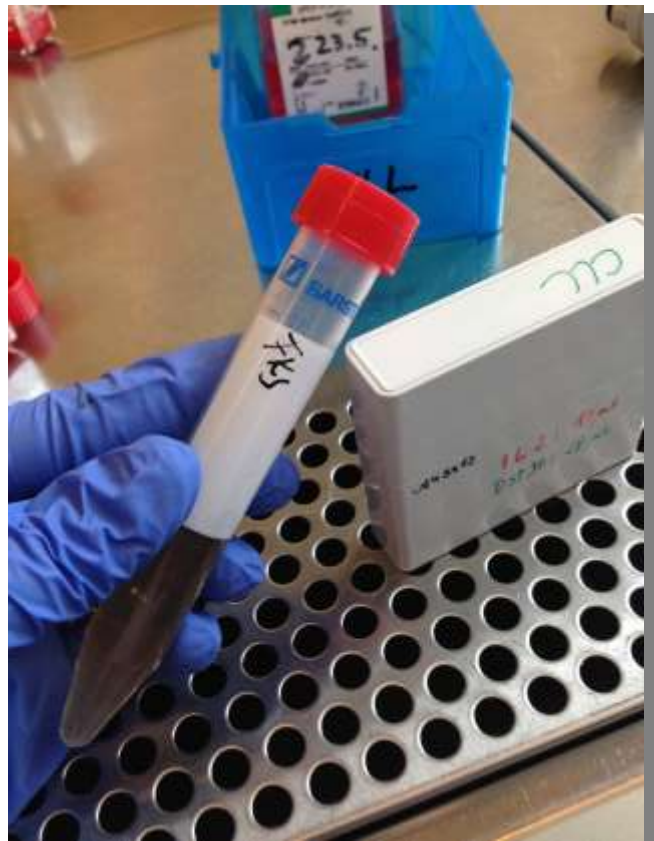


Abbildung 5: CLL-Zusatz FKS im Vordergrund, verwendetes Medium und Stimulanzen im Hintergrund.

Nachdem diese Zusätze jeweils in die beiden Kulturflaschen gegeben wurden, werden auch diese in den Brutschrank gestellt.

4.1.2 Präparation

Bevor die Kulturen präpariert werden können, erhalten sie je nach Länge der Kultivierungszeit verschiedene Vorbehandlungen. Die 24h Th Kultur wird mit einem Tropfen Colcemid für eine halbe Stunde vor der Präparation behandelt. Die 48h Th und die 72h Th Kultur erhalten jeweils 4h Colcemid-Behandlung.

Nachdem die Zeit vorbei ist, wird die Zellsuspension der jeweiligen Kulturflaschen in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und 10 Minuten bei 22°C und 1500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Danach wird der Überstand aus dem Röhrchen abgenommen und die restliche Zellsuspension aufgeschüttelt. Das Röhrchen wird für den Waschschrift mit HBSS, welches zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde aufgefüllt, verschlossen und erneut unter denselben Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Nachdem der Waschschrift durchgeführt wurde, erfolgt anschließend die hypotone Behandlung mit KCL. Der Überstand im Röhrchen wird erneut abgenommen, der Bodensatz aufgeschüttelt und das Gefäß mit KCL aufgefüllt bevor es für 20 Minuten im Wasserbad inkubiert wird. Währenddessen wird die Zentrifuge auch 4°C runtergeköhlt. Nach der hypotonen Behandlung wird die Probe erneut zentrifugiert, diesmal jedoch bei 4°C statt 22°C. Anschließend werden vier Fixierungsschritte durchgeführt. Dabei benutzt man ein Methanol/Essigsäure-Gemisch im Verhältnis 3:1 (Methanol : Essigsäure). Dieses Gemisch wird Fixativ genannt. Der Überstand der Probe wird zunächst wieder abgenommen und der Bodensatz aufgeschüttelt. Anschließend tropft man vorsichtig das Fixativ in das Röhrchen und füllt es somit auf. Danach wird die Probe wieder bei 4°C zentrifugiert. Nachdem der erste Fixierungsschrift durchgeführt wurde kann nun das Fixativ bei den nächsten drei Schritten in das Röhrchen geschüttet anstatt getropft werden. Die Vorgehensweise für Abnehmen des Überstandes, Aufschütteln und Zentrifugieren bleiben gleich.

4.1.3 Auftropfen

Nachdem die vier Fixierungsschritte durchgeführt wurden wird erneut der Überstand abgenommen und der Bodensatz aufgeschüttelt. Pro Kultur werden jeweils zwei verschiedene Objektträger getropft. Diese unterscheiden sich durch Farbe und Marke sowie durch ihren Kantenschliff(geschliffen/ungeschliffen). Es wird eine 3ml-Pipette

wird. Für das anschließende Spülen werden zwei Bechergläser mit Leitungswasser bereitgestellt.

Die Bänderungszeiten im Trypsin sind für die zwei verschiedenen Arten von Objektträgern unterschiedlich. Geschliffene Objektträger werden 50 Sekunden trypsinisiert, ungeschliffene Objektträger 60 Sekunden. Nach der Trypsinierung werden die Objektträger zunächst in der Küvette die nur Phosphatpuffer enthält gespült und dann für 6 Minuten in der Färbeküvette gefärbt. Nach Ablauf der Zeit werden Sie zweimal in den Bechergläsern mit Leitungswasser gespült und danach bei Raumtemperatur getrocknet. In Abbildung 7 ist der Versuchsaufbau für die Bänderung dargestellt (Abbildung 7).



Abbildung 7: Aufbau für die Bänderung der Objektträger.

4.2 Auswertung mittels Metaphasensuchers und Ikarus-Software

Für jeden Fall müssen ausreichend viele Metaphasen ausgewertet werden um ein klares Ergebnis zu erhalten um somit einen Befund zu ermitteln. Die getrockneten Objektträger werden hierfür nach Fallnummer und Nummerierung sortiert und in den Metaphasensucher von Metasystems eingeräumt. Dieser besteht aus einem Tower in dem sich 16 Rahmen befinden in die jeweils 5 Objektträger passen, einem Greifarm, der die Platten aus dem Tower nimmt und diese anschließend auf dem Objektstisch platziert und einem

Lichtmikroskop, welches mit einer Kamera ausgestattet und mit einem Computer verbunden ist. Der Aufbau und die Bestandteile des Metaphasensuchgerätes sind in Abbildung 8 dargestellt (Abbildung 8). Die Objektträger werden zunächst in die Platten des Towers einsortiert und danach die Daten im System von Metasystems eingegeben und gespeichert. Anschließend wird die Suche gestartet, der Objektisch durch den Greifarm mit der ersten Platte aus dem Tower bestückt und das Mikroskop für die Objektträger fokussiert. Der Metaphasensucher nimmt anschließend jede Metaphase die er findet auf und speichert sie ab. Danach werden die am qualitativ hochwertigsten Metaphasen am Computer ausgewählt. Diese werden dann vergrößert erneut aufgenommen und im System von Ikarus abgespeichert, welches von den anderen Computern aus im Labor erreichbar ist. Mithilfe des Ikarus Systems ist es anschließend möglich die Metaphasen zu bearbeiten und die benötigten Karyogramme für den Befund zu legen. Es müssen 20 – 25 Karyogramme gelegt werden um ein meist eindeutiges Ergebnis zu erzielen.

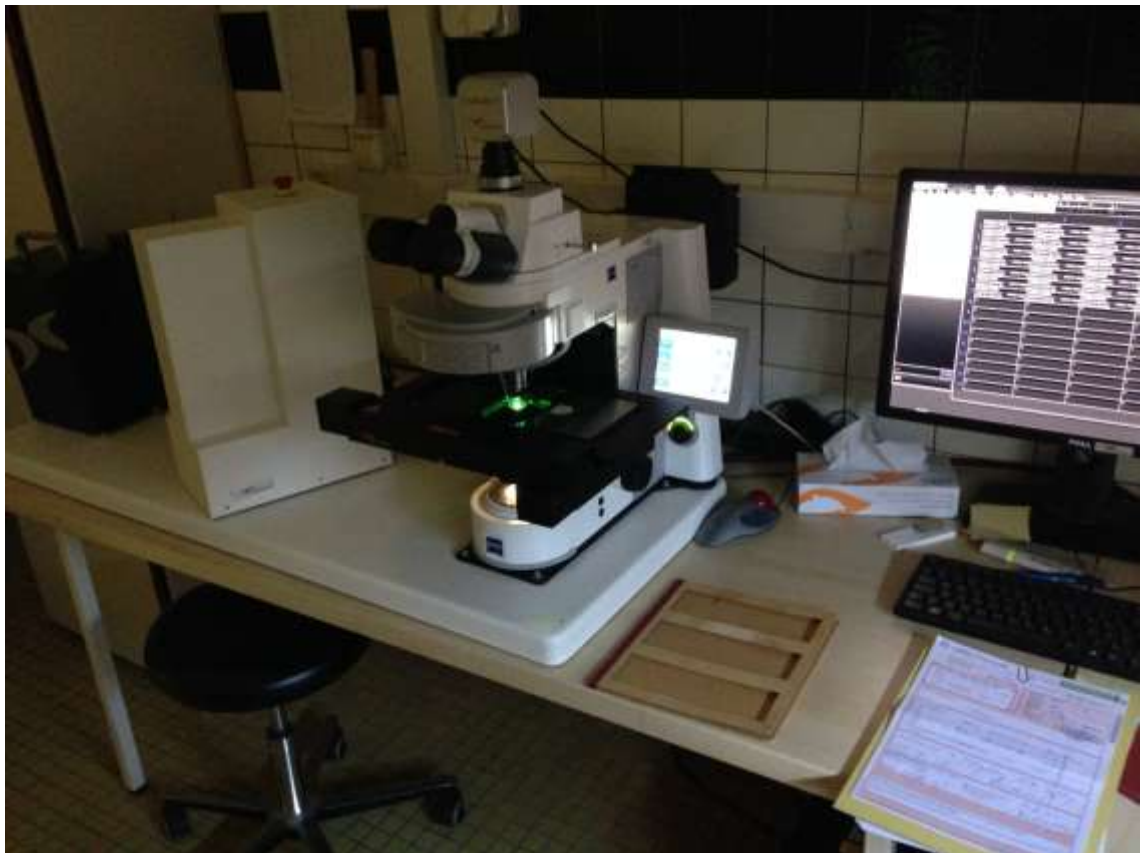


Abbildung 8: Aufbau des Methapasensuchers mit Tower (Links), Greifarm (rechts neben Tower), Lichtmikroskop (Mitte) und Computer (rechts)

5 Ergebnisse

Durch die Kultivierung, die anschließende Präparation der Proben und das Auftropfen sowie Bändern der Objektträger konnten Metaphasen-Chromosomen angefertigt werden. Die beiden Zellkulturstimulanzen wurden erfolgreich angewendet um die B-Zellen zu stimulieren und somit waren die typischen Aberrationen für chronisch lymphatische Leukämie in den Metaphasen teilweise zu sehen. Es wurden insgesamt im gesamten Praktikumszeitraum 18 BCLL-Fälle ausgewertet, wobei 13 mal der Verdacht auf eine BCLL bestätigt wurde, 2 mal der Verdacht nicht bestätigt wurde und 3 mal keine Aussage getroffen werden konnte, da der endgültige Befund nicht einsehbar war (Tabelle 2). Bei allen 18 Fällen konnten in den 48h und 72h Kulturen Metaphasen zur Auswertung gewonnen werden. Nur in 9 von 18 Fällen konnten Metaphasen in den 24h Kulturen gewonnen werden. Die Qualität der untersuchten Metaphasen war sehr unterschiedlich und variierte von Fall zu Fall und auch zwischen den Kulturen der einzelnen Fälle. Wenige der Fälle wiesen sehr gute Qualität auf, viele jedoch mittelmäßige bis schlechte Qualität. Es war unabhängig von der Qualität möglich die typischen Aberrationen in den Metaphasen nachzuweisen, jedoch war dies meist nur in einzelnen Metaphasen möglich. Ebenso wurde deutlich, dass die Aberrationen unabhängig vom Probenmaterial nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 2: Übersicht der untersuchten Proben

Probennummer	Geschlecht	Probenmaterial	Diagnose
1	Weiblich	Knochenmark	B-CLL
2	Weiblich	Peripheres Blut	B-CLL
3	Männlich	Peripheres Blut	Nicht möglich
4	Weiblich	Knochenmark	B-CLL
5	Weiblich	Peripheres Blut	Nicht möglich
6	Männlich	Peripheres Blut	Nicht möglich
7	Weiblich	Knochenmark	B-CLL
8	Weiblich	Peripheres Blut	B-CLL
9	Männlich	Knochenmark	B-CLL
10	Männlich	Peripheres Blut	B-CLL
11	Weiblich	Knochenmark	B-CLL
12	Männlich	Knochenmark	B-CLL
13	Männlich	Knochenmark	B-CLL
14	Männlich	Knochenmark	B-CLL
15	Männlich	Knochenmark	Keine B-CLL
16	Männlich	Knochenmark	B-CLL
17	Männlich	Knochenmark	B-CLL
18	Männlich	Knochenmark	Keine B-CLL

Mithilfe der konventionellen Chromosomenanalyse konnten einige für die B-CLL typischen Aberrationen nachgewiesen werden. Es wurden teilweise Aberrationen für einen prognostisch günstigen bzw. ungünstigen Krankheitsverlauf beobachtet und ausgewertet. In Abbildung 8 und 9 werden zwei Beispiele von verschiedenen Fällen dargestellt, einerseits mit einer günstigen, andererseits mit einer ungünstigen Chromosomenkonstellation (Abbildung 8,9). In Abbildung 8 ist ein Karyogramm dargestellt, welches keine Aberrationen aufweist, was für eine gute Prognose für den Verlauf der Krankheit steht. Die ungünstige Prognose aus dem Karyogramm der Abbildung 9 erschließt sich durch die Trisomie des Chromosoms 12. Die Karyogramme aller bearbeiteten Proben wurden während des Praktikums selbständig gelegt und anschließend ausgewertet.

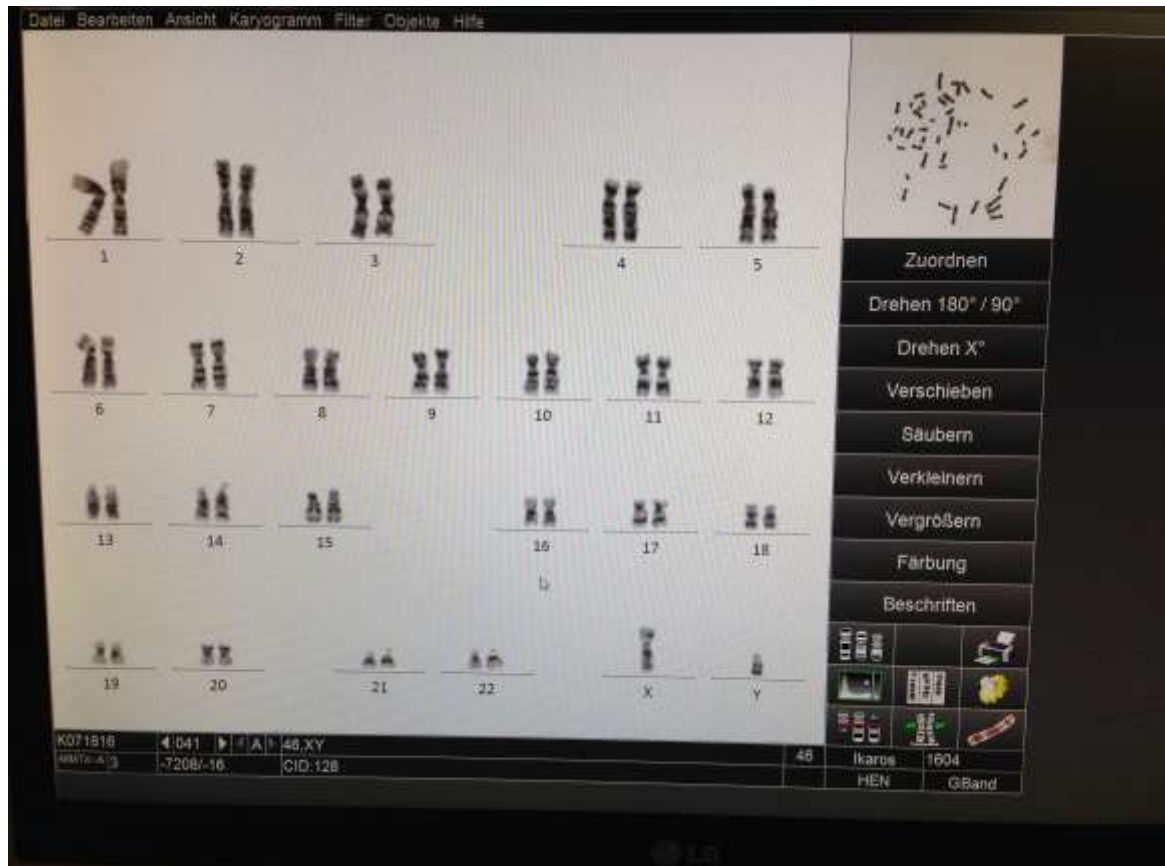


Abbildung 8: vollständiges Karyogramm ohne Aberrationen; günstige Faktoren

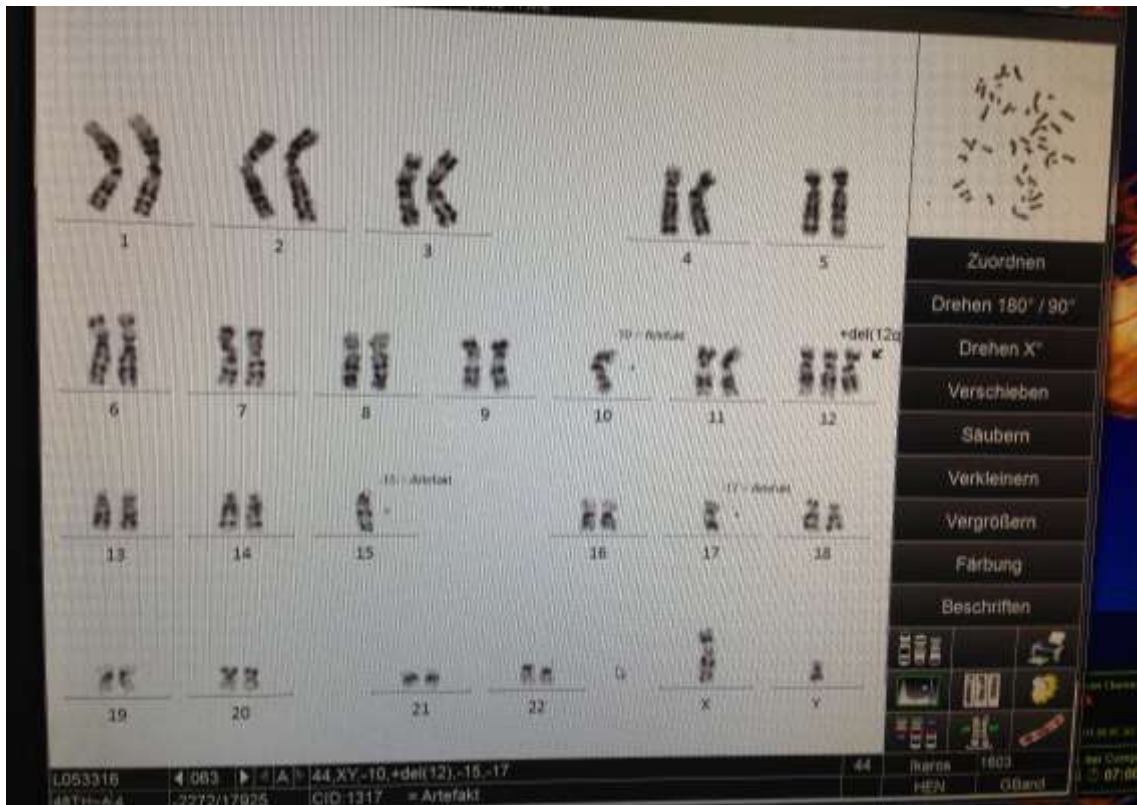


Abbildung 9: Karyogramm mit Aberration +del(12q); ungünstiger Faktor

Aufgrund der niedrigen Proliferationsaktivität von CLL-Zellen in vitro waren die aus der Chromosomenbänderungsanalysen gewonnenen Daten eher gering. Jedoch wurde die Kultivierungstechnik dieser Zellen durch die Nutzung von den beiden Zellkulturstimulanzen DSP30 und IL-2 verbessert (Haferlach et al.). Eine Gesamtanzahl von 18 Proben wurde in dem Praktikumszeitraum mittels klassischer Chromosomenanalyse unter Nutzung der genannten Zellkulturstimulanzen analysiert und ausgewertet um bestimmte CLL-typische und andere Chromosomenaberrationen nachzuweisen. Es wurden Proben von 11 Männern (61,11%) und 7 Frauen (38,89%) untersucht. Das mediane Alter der Patienten lag bei dieser Versuchsreihe bei 71,38 Jahren (Alterspanne von 57 - 93). 16 von 18 Patienten (88,89%) waren im Alter von über 60, 2 von 18 Patienten (11,11%) waren unter 60 Jahre alt. In welchem Stadium der Krankheit sich die Patienten befanden oder welche medikamentöse Behandlung sie bereits erhielten war nicht bekannt.

Bei allen 18 Proben (100%) konnten erfolgreich Metaphasen-Chromosomen für diese Arbeit hergestellt und auf Chromosomenaberrationen untersucht werden. Bei 11 von 18

(61,11%) Proben konnten keine Metaphase-Chromosomen für die 24h-Kultur hergestellt werden. Für die 48 und 72h Kultur konnten durch die Zusätze in allen (100%) Fällen Metaphasen-Chromosomen angefertigt werden. Aberrationen konnten durch die klassische Chromosomenanalyse in allen Proben festgestellt werden, wobei bei 4 von 18 Proben nur sehr selten Aberrationen in den Karyogrammen zu sehen waren (meist nur in 2 bis 5 Karyogrammen von 25) und bei 2 von diesen 4 aus 18 Proben nur 3 Karyogramm insgesamt ausgewertet wurden und somit keine richtige Aussagekraft entstanden ist. Es handelte sich bei den Aberrationen dieser 4 Fälle zu 100% um fehlende Chromosomen (Monosomien, siehe Anhang 1). Es kann bei diesen Fällen möglich sein, dass Chromosomen durch die Präparation zu weit von der Metaphase entfernt wurden und bei der Aufnahme der Metaphasen somit nicht mit erfasst werden konnten. Eindeutige, aussagekräftige und nicht als Artefakt geltende Chromosomenaberrationen sind demnach bei 14 von 18 Proben (77,78%) nachgewiesen worden (Haferlach et al.).

In den 18 untersuchten Fällen konnten verschiedenste chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden. Unter anderem Monosomien, Trisomien, Translokationen, Deletionen und Derivate von Chromosomen. Die Gesamtanzahl der einzelnen genetischen Anomalien wurden in Tabelle 3 und 4 zusammengefasst dargestellt. Es wurden auch Aberrationen an den für die B-CLL typischen Chromosomen gefunden (Chromosom 13 (5 mal), 11 (4 mal), 6 (4 mal) und 17 (4 mal)) (in der Tabelle markiert).

Tabelle 3: nachgewiesene Chromosomenaberrationen 1

Art der Aberration/ Bezeichnung	Vorkommen der Aberration, Gesamtanzahl (wie oft bei den 18 untersuchten Fällen)
Monosomie 1	2
Monosomie 2	5
Monosomie 3	7
Monosomie 4	2
Monosomie 5	1
Monosomie 6	3
Monosomie 7	3
Monosomie 8	4
Monosomie 9	9
Monosomie 10	9
Monosomie 11	5
Monosomie 12	4
Monosomie 13	7
Monosomie 14	3
Monosomie 15	4
Monosomie 16	7
Monosomie 17	6
Monosomie 18	9
Monosomie 19	4
Monosomie 20	4
Monosomie 21	9
Monosomie 22	5
Monosomie X	4
Monosomie Y	4
Trisomie 1	1
Trisomie 6	1
Trisomie 14	1
Trisomie 20	1

Markerchromosom	2
-----------------	---

Tabelle 4: nachgewiesene Chromosomenaberrationen 2

Art der Aberration/ Bezeichnung	Vorkommen der Aberration, Gesamtanzahl (wie oft bei den 18 untersuchten Fällen)
Translokation (11;17)	1
Translokation (1;20)	1
Translokation (5;13)	1
Translokation (7;13)	1
Translokation (6;16)	1
Translokation (11;21)	1
Translokation (1;1)	1
Deletion (6q)	1
Deletion (17p)	1
Deletion (4p)	1
Deletion (8q)	1
Deletion (1q)	1
Deletion (13q)	2
+ Deletion (12)	1
Deletion (20q)	1
Deletion (11q)	5
Deletion (7q)	1
Klonale Chromosomen	1
Derivate (17)	1
Derivate (13)	1
Derivate (4)	1
Derivate (18q)	1
Derivate (20)	1
Derivate (5)	1
Derivate (11q)	1
Derivate (21)	2

Derivate (1)	1
--------------	---

6 Diskussion

6.1 Allgemeine Diskussion über die erreichten Ergebnisse

In der genetischen Diagnostik hämatologischer Neoplasien erlaubte die konventionelle Chromosomenanalyse es einen Überblick über die genetischen Veränderungen, die mit dem Mikroskop sichtbar sind, zu erlangen. Nur die niedrige Proliferationszeit der CLL-Zellen war bisher ein Hindernis bei der Durchführung. Durch ein Protokoll zur Einführung der Kultivierung und Stimulation von B-Zellen durch die Kombination der Zellkulturstimulanzen DSP30 und IL-2 wurde die Ausbeute an aberranten Metaphasen deutlich erhöht (Mayr et al., 2006; Dicker et al., 2006; Haferlach et al., 2007).

In diesem Praxismodul sollten in der Humangenetik Abteilung des Zentrums für Diagnostik GmbH deshalb diese Zellkulturstimulanzen für die Verbesserung der Diagnostik chronisch lymphatischer Leukämie eingeführt werden. Es war von Interesse herauszufinden, ob die Einführung dieser Zellkulturstimulanzen erfolgreich sein würde und ob mithilfe der konventionellen Chromosomenanalyse für die B-CLL-typische Aberrationen beobachtet werden könnten.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die B-Zellen in den Kulturen mit den zugesetzten Stimulanzen erfolgreich stimuliert wurden. Es konnten in 17 von 18 Fällen Metaphasen dieser Kulturen erfolgreich ausgewertet werden wobei in den normal angesetzten 24h Th Kulturen nur in 9 von 18 Fällen Metaphasen entstanden sind. Was die Qualität der Metaphasen der verschiedenen Fälle sowie Kulturen betrifft, ist nicht eindeutig klar, wieso so große Unterschiede bei der immer gleichen Vorgehensweise entstehen konnten. Nichtsdestotrotz waren nur vereinzelte aufgenommene Metaphasen nicht auswertbar und mussten aus dem Programm gelöscht werden. Inwieweit die Qualität oder Ausbeute an auswertbaren Metaphasen von der Art des Probenmaterials abhängig ist konnte auch noch nicht geklärt werden, falls überhaupt ein Zusammenhang besteht.

6.2 Diskussion über die Durchführung der Experimente

Die Vorgehensweise und Durchführung der einzelnen Methoden nach genauen Anweisungen und Vorschriften haben dafür gesorgt, dass die erforderlichen Metaphasen-Chromosomen erfolgreich angefertigt werden konnten. Jeder der einzelnen Schritte besitzt einen molekularbiologischen Hintergrund welcher für die erfolgreiche Durchführung der Versuchsreihe von Bedeutung war.

Das bei Ansatz und Kultivierung verwendete RPMI Medium für die 48 und 72h Th Kulturen der BCLL wurde verwendet, da es die Entwicklung unreifer Zellen anregt, die für die konventionelle Chromosomenanalyse bei einer CLL notwendig sind. Die Kombination der beiden untersuchten Zellkulturstimulanzen IL-2 und DSP30 führten zur erfolgreichen Stimulation der B-Zellen die sich in dem benutzten Probenmaterial (Knochenmark oder Peripheres Blut) befanden. Auf die speziellen Abläufe der Stimulation der Zellen durch diese Stoffkombination wird im nächsten Abschnitt genau eingegangen.

Nach der Kultivierung wurde Colcemid eingesetzt, welches ein synthetisches Analog zu Colchizin darstellt. Colchizin ist ein Alkaloid der Herbstzeitlose und weitaus giftiger als Colcemid. Dieser synthetische Stoff wird verwendet um das „Wachstum“ zu stoppen bzw. zu unterbrechen. Chromosomen sind nur erkennbar, wenn sie maximal kontrahiert werden, was nur während der Zellteilung (in Kultur) geschieht. Colcemid bewirkt, dass die Spindelfasern Absterben und somit das Auseinanderweichen der Schwester-Chromatiden verhindert wird.

Nachdem das Wachstum der Zellen unterbrochen wurde, wurde die Zellsuspension mit einer hypotonen Lösung (KCL) behandelt. Die Konzentration an Salz der Kaliumchlorid-Lösung außerhalb der Zellen ist niedriger als in der Zelle selbst. Durch die hypotone Lösung wurde das Zellvolumen durch den Effekt der Osmose erhöht. Der unterschiedliche Salzgehalt von Zelle und Umgebung wurde ausgeglichen, indem Wasser durch die Zellmembran ins Innere der Zelle geflossen ist. Durch das erhöhte Salzvolumen haben die Chromosomen mehr Platz und konnten sich somit besser ausbreiten. Ebenfalls von Vorteil ist das aufquillen des Chromatin, welches dadurch besser sichtbar gemacht wird. Durch das erwärmen der hypotonen Lösung im Wasserbad auf 37°C wurde der Wassertransport in die Zelle beschleunigt und der Effekt erhöht.

Nachdem die hypotonen Behandlung durchgeführt wurde, konnte nun die Gewebestruktur durch die Fixierung konserviert werden. Die Zugabe von Fixativ zur Zellsuspension stellt demnach einen Konservierungsprozess dar bei dem der Verlust von Nukleinsäuren verhindert und Struktur der Zellen fixiert wird. Die Aktivität endogener Nukleasen und anderer gewebeabbauender Enzyme werden durch die Denaturierung gering gehalten und die Zellmembran elastisch fixiert. Der pH-Wert der Zelle wird durch das Fixativ gesenkt und denaturiert, anschließend dehydriert, Proteine und DNA verändert und das Wasser im Zellinneren entfernt und mit Methanol ersetzt. Chromatin und Zellmembran werden gehärtet und die Chromosomen für die nachfolgende Bänderungsprozedur präpariert. Durch die Fixierung der Zellen ist es möglich diese nun wochenlang im Tiefkühlschrank aufzubewahren. Um eine Bänderung zu ermöglichen wird ein Methanol-Essigsäure-Gemisch im Verhältnis 3:1 verwendet. Das Methanol fungiert als Zellhärtungswirkstoff, wohingegen die Essigsäure ein Weichmacher darstellt. Durch die Lagerung des Fixativ bei -20°C wird seine Funktion für den Schutz der Chromosomenmorphologie gewährleistet. Die Härtung der Zellmembran ist wichtig um dem späteren Auftropfen standzuhalten.

Die Alterung der Objektträger schließt sich an das Auftropfen der Zellsuspensionen auf die Objektträger an. Der Alterungsprozess ist sehr wichtig, um eine gute Bänderung der Chromosomen zu erreichen. Dies geschieht durch das weitere trocknen der Präparate und Verdunstet von überschüssigem Wasser.

Nachdem die Objektträger erfolgreich gealtert wurden, konnten sie anschließend gebändert werden. Es wurde bei diesem Experiment die GTG-Bänderung (Giemsa-Bänderung mit Trypsin) angewendet, welche wie andere G-Bänderungen das normale Chromosomenmuster von meiotischen Chromosomen steigert. Für das allgemeine Verständnis ist es wichtig zu wissen, dass Chromatin in zwei Hauptgruppen unterteilt wird: Euchromatin und Heterochromatin. Konstitutives Heterochromatin ist stark verdichtet (kondensiert), während der Interphase transkriptionell inaktiv und wiederholt sich oftmals. Wohingegen Euchromatin während der Interphase dekontensiert, um eine Gentranskription stattfinden zu lassen. Entlang der Chromosomenarme variiert die Funktion und Struktur des Chromatin. Durch die Bänderung (Färbetechnik) kann der Zeitpunkt der DNA-Replikation sowie die Basenabfolge dargestellt werden. Giemsa-Bänder, die positiv sind, sind CG-arm und AT-reich in ihrer Zusammensetzung. Dunkle Bänder

stehen demnach für CG-arme Regionen, wohingegen CG-reiche Regionen als helle Giemsa-Bänder zum Vorschein treten. Mithilfe der Giemsa-Färbung und vorherigen Behandlung mit Trypsin entstanden entlang der Chromosomen abwechselnd gefärbte Abschnitte (G-Banden, G für Giemsa)und ungefärbte Abschnitte (R-Banden, R für revers). Die stoffliche Grundlage für das unterschiedliche Verhalten bei der Färbung nach der Trypsinbehandlung ist bis heute nicht geklärt (Huber, 2013) (Zytogenetische Analyse KM).

6.3 Stimulation der B-Zellen durch DSP30 in Kombination mit IL-2

Das durchgeführte Experiment hat das deutliche Ergebnis, dass bei 17 von 18 Fällen in den 48h und 72h Kulturen auswertbare Metaphasen entstanden sind welche CLL-typische Aberrationen beinhalteten. Die benötigten B-Zellen deren Aberrationen bei der Prognose der B-CLL von großer Aussagekraft sind, konnten demnach erfolgreich stimuliert werden.

B-CLL-Zellen besitzen eine Apoptoseinhibition, was bedeutet, dass sie langlebig sind und nicht Absterben – sie vermehren sich immer weiter. Durch die geringe Dichte der T-Zell-aktivierenden Oberflächenmoleküle führen sie zu einer unzureichenden Immunantwort. Durch die Kombination von DSP30 und IL-2 kommt es zur Hochregulierung der Oberflächenmoleküle maligner und normaler B-Zellen. Ebenso werden die Proliferation und Sekretion von Zytokinen und Immunoglobulin induziert (URL 11).

Die Stimulation der B-Zellen ist eine Notwendigkeit, wenn es sich um die genetische Diagnostik von chronisch lymphatischer Leukämie handelt. Jedoch ist nicht klar, ob die Vorgehensweise oder Stimulation der B-Zellen noch verbessert oder optimiert werden kann.

Die Chromosomenbänderungsanalysen haben bei mehreren malignen hämatologischen Erkrankungen wichtige Informationen in Bezug auf Biologie und Prognose hervorgebracht. Die CBA (Chromosomenbänderungsanalyse) hat gegenüber anderen Techniken den Vorteil, dass alle mikroskopisch sichtbaren genetischen Anomalien in bösartigen Tumoren übersichtlich erfasst werden können. Für diesen Nachweis der genetischen

Fehler ist es hierbei nicht erforderlich, dass bekannt ist welche Fehler gesucht werden, wie es bei der FISH-Methode notwendig ist: Die CBA erfordert jedoch die Zellteilung in vitro. In vitro zeigen CLL-Zellen einen niedrigen mitotischen Index, welcher dafür verantwortlich ist, dass in der Vergangenheit die Fehlerquote der CBA sehr hoch und der Anteil an Fällen, bei denen Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden konnten sehr gering war (Gahrton et al. 1980, Juliusson G. et al., 1990).

Durch die Zugabe von den zwei Zellkulturstimulanzien DSP30 und IL-2 zu dem Kulturmedium wurde dieses Problem jedoch überwunden und die Erfolgsrate stieg deutlich an (Dicker et al., 2006).

Bevor diese Verbesserungen der Kultivierung eingeführt wurden, wurde für die genetische Charakterisierung einer chronisch lymphatischen Leukämie meist die FISH-Technik an Interphase-Kernen durchgeführt, da diese nicht von der Zellteilung in vitro abhängig ist. Um eine CLL durch die FISH-Methode zu analysieren werden Sonden verwendet um Trisomien 12 oder Deletionen von 6q21, 11q22.3, 13q14 und 17p13 nachzuweisen. Durch diese Technik werden in 80% aller Fälle von CLL Aberrationen festgestellt (Stilgenbauer et al., 1998, Reddy et al., 2006, Döhner et al., 1910-1916).

In einer Pilotstudie wurde die CBA bei 125 von 132 (94,7%) CLL Fällen erfolgreich durchgeführt und aberrante Karyotypen in 101 von 125 (80,8%) Fällen nachgewiesen. Diese Ausbeute ist fast zweimal so hoch wie bei früheren CBA Studien und vergleichbar mit der Aberrationsrate von FISH-Analysen. Quelle 11 Die Verwendung von CD40 als Zellkulturstimulanz hat bei zwei anderen Studien zu vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich der Metaphase-Erzeugung und der chromosomalen Aberrationen geführt (Buhmann et al., 2002, Mayr et al., 2006).

Bei der eigens durchgeführten Versuchsreihe konnten bei allen Fällen Metaphase-Chromosomen hergestellt werden und bei 14 von 18 (77,78%) Fällen eindeutige chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden. Diese Quote (77,78%) ist vergleichbar mit der Quote (80,8%) der Aberrationen bei der oben genannten Studie. Auch wenn in der eigens durchgeführten Versuchsreihe aufgrund des kürzeren Zeitraumes deutlich weniger Fälle analysiert wurden, wird jedoch deutlich, dass die Erfolgsquote der CBA durch Zusatz der Zellkulturstimulanzien DSP30 sowie IL-2 konstant hoch ist. In einer weiteren Studie wurden erneut 506 Fälle von CLL untersucht um die CBA weiter zu untersuchen. Bei dieser Studie zeigte sich, dass die Chromosomenbänderungsanalyse

eine sehr effiziente Methode ist, wenn die Proben innerhalb von 48h nach der Extraktion im Labor eintreffen. Bei dieser Studie wurde bei 98,8% aller untersuchten Fälle eine ausreichende Anzahl an Metaphasen gewonnen um ein zuverlässiges Ergebnis des Karyotyps zu erhalten. Sie fanden heraus, dass die CLL sich vor allem durch genomische Ungleichgewichte oder Verluste, die die Chromosomen 13, 11, 6 und 17 sowie den Gewinn des Chromosoms 12, auszeichnet. Diese Chromosomenaberrationen schließen sich untereinander jedoch nicht aus. Die selbst erhaltenen Ergebnisse der durchgeführten Versuchsreihe lassen sich auch mit dieser Studie vergleichen. Ein zuverlässiges Ergebnis des Karyotyps, also ausreichend viele Metaphasen konnten bei 16 von 18 (88,89%) Fällen gewährleistet werden. Durch die geringe Anzahl an untersuchten Fällen unterscheidet sich die Quote hier zwar etwas deutlicher von der Studie auf die sich bezogen wird. Jedoch ist auch die eigene Erfolgsquote durch die Stimulation der Kulturen sehr hoch. Auch bei der eigenen Versuchsreihe konnten viele chromosomale Anomalien nachgewiesen werden. Es wurden Monosomien, Trisomien, Translokation, Deletionen sowie Derivate- oder Markerchromosomen nachgewiesen. An den CLL-typischen Chromosomen 13 (5 genetische Veränderungen), 11 (4 genetische Veränderungen), 6 (4 genetische Veränderungen) und 17 (4 genetische Veränderungen) konnten ebenfalls wie in anderen Studien belegt, Anomalien verschiedenster Art festgestellt werden (siehe Tabelle 2). (Quelle Paper allgemein) Der Zugewinn des Chromosoms 12 konnte nur bei einem der untersuchten Fälle nachgewiesen werden, jedoch dort zu 100% in allen 23 analysierten Karyogrammen (siehe Anhang).

Die am öftesten vorkommende Chromosomenaberration bei der chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL) die durch die klassische Chromosomenanalyse nachgewiesen wurde ist die Trisomie 12, gefolgt von Abnormalitäten des langen Armes der Chromosomen 13, 14 und 11. Komplex veränderte Karyotypen, Trisomie 12 und Veränderungen des langen Arms des Chromosoms 14 wurden mit einer schlechten Prognose für den weiteren Krankheitsverlaufs assoziiert (Haferlach et al., 2007).

Patienten mit einer genetischen Anomalie des Chromosoms 13 erhalten für ihren weiteren Krankheitsverlauf eine positive Prognose. In weiteren Studien wurden Fälle, bei denen Aberrationen des Chromosoms 13 durch die FISH-Analyse nachgewiesen wurden, mithilfe der CBA auf weitere Veränderungen untersucht. Durch diese Untersuchungen mit der klassischen Chromosomenanalyse konnte ein Überblick über weitere

Chromosomenaberrationen neben der des Chromosoms 13 gewonnen werden. Die FISH-Analyse hatte bei 215 Patienten eine positive Prognose gestellt, da eine 13q-Deletion als einzige Aberration entdeckt wurde. Durch die CBA konnten bei 73 dieser 215 Fälle weitere Aberrationen festgestellt werden, was die Prognose dieser betroffenen Patienten wahrscheinlich verschlechtert. Dies muss jedoch in weiteren Studien geklärt werden. In einer kleineren Studie von 43 Patienten mit einer 13q-Deletion welche durch FISH-Analyse diagnostiziert wurde, konnten bei 11 dieser Patienten durch die CBA weitere Aberrationen festgestellt werden. Bei dieser kleinen Studie zeigte sich, dass das mediane Überleben verkürzt wurde, wenn neben der 13q-Deletion weitere Aberrationen vorhanden waren. Ohne Behandlung sank ihr medianes Überleben auf 41 Monate, anstatt 132 Monate ohne Behandlung wenn nur eine 13q-Deletion vorlag (Mayr et al., 2006).

Diese Studien zeigen, dass die klassische Chromosomenanalyse notwendig ist, um erstens einen Überblick über alle mikroskopisch sichtbaren genetischen Veränderungen im Karyotyp zu geben und zweitens um andere Techniken, wie die FISH-Methode bei der nur bestimmte Aberrationen untersucht werden zu vervollständigen und die Ergebnisse abzusichern. Ebenso ist es anders herum notwendig die klassische Chromosomenanalyse mithilfe anderer Methoden zu verbessern und zu vervollständigen, da spezielle Genbereiche auf den Banden der Chromosomen bei der CBA meist nicht genau zu erkennen sind und somit Befunde die diese Regionen betreffen nicht eindeutig gegeben werden können. Für diese Bereiche gibt es jedoch Sonden, die in der FISH-Analyse benutzt werden um speziell nach Anomalien dieser Gene auf den Chromosomen zu suchen.

7 Ausblick

Es hat sich durch die Versuche während dieses Praxismoduls gezeigt, dass die klassische Chromosomenanalyse allein noch weit von einer Eindeutigkeit eines Befundes entfernt ist, da sie nur einen Gesamtüberblick über die genetischen Anomalien bietet. Es lässt sich nicht eindeutig bestätigen, ob es sich um eine ungünstige oder günstige Prognose handelt, wenn zum Beispiel nur in 3 von 25 Metaphasen eine bestimmte Veränderung der Chromosomen zu erkennen ist. Erst durch eine Kombination aus verschiedenen Analyseverfahren kann eine umfassende Untersuchung der genetischen Veränderungen bei einer B-CLL durchgeführt werden. Deshalb ist es für einen eindeutigen Befund notwendig eine klassische Chromosomenanalyse sowie eine FISH-Analyse oder Ähnliches durchzuführen. Der parallele Einsatz dieser Verfahren sollte für die Diagnostik der CLL und ähnlicher niedrigmaligner B-Zell-Lymphome als Standardmethode angewendet werden. Außerdem sollten als Stimulanzien für diese Tumorzellen DSP30 in Kombination mit IL-2 eingesetzt werden, da die B-Zellen dadurch nachweislich erfolgreich stimuliert werden. Die Stimulation der CLL-Zellen ist durch diese Zellkulturstimulanzien einfach und effizient, was einen großen Vorteil darstellt.

Es wird also deutlich, dass die Einführung der Anwendung von Zellkulturstimulanzien für die Befundsuche einen großen Vorteil bringt, vor Allem in Kombination mit der FISH-Analyse. Diese Anwendung stellt einen neuen wissenschaftlichen Fortschritt im Kampf gegen den Krebs dar – einer Krankheit, die wie wohl kaum eine andere, mit Angst behaftet ist.

Es ist durch die Zusätze möglich die klassische Chromosomenanalyse für die Prognoseabschätzung einer chronisch lymphatischen Leukämie zu verwenden. Dies war lange Zeit nicht möglich da die CLL-Zellen nicht erfolgreich stimuliert und zum Wachstum angeregt werden konnten. Durch die Kombination mit anderen Methoden ist es möglich eindeutige Befunde zu erhalten, die die weitere Behandlung von Patienten verbessern kann.

8 Zusammenfassung

Bisher war der alleinige Einsatz der FISH-Analyse als genetische Standardmethode für die Diagnostik der chronisch lymphatischen Leukämie etabliert. Dieses Verfahren beschränkt sich jedoch auf die gezielte Suche genetischer Veränderungen. Einen Überblick über sämtliche mikroskopisch sichtbare chromosomale Veränderungen liefert im Gegensatz die konventionelle Chromosomenanalyse. Dieses Verfahren eignete sich durch die zu geringe Proliferationsrate der CLL-Zellen jedoch nicht für den Einsatz in der Routinediagnostik. Seit einiger Zeit jedoch ist es möglich die Zellkulturstimulanzien DSP30 und IL-2 zu kombinieren um sie für die Stimulation von CLL-Zellen zu nutzen. Durch diese Anwendung kann nun auch die konventionelle Chromosomenanalyse in der Routinediagnostik genutzt werden. Sie dient somit der Prognoseabschätzung, da einige CLL-typische Veränderungen der Chromosomen eine Wirkung auf den Verlauf dieser Krankheit besitzen. Das Aberrationen mit der konventionellen Chromosomenanalyse unter Nutzung der Stimulanzien DSP30/IL-2 sichtbar gemacht werden können, ist vollends geklärt. Es hat sich eindeutig gezeigt, dass CLL-typische Aberrationen durch die klassische Chromosomenanalyse beobachtet werden können und somit die Kombination der beiden Zellkulturstimulanzien für die Prognoseabschätzung eine große Bedeutung hat.

Literaturverzeichnis

Internet :

URL 1 (14.04.2016) Gunnar Römer: *Zytogenetik*, URL:
<http://flexikon.doccheck.com/de/Zytogenetik>

URL 2 (14.04.2016) Roche Pharma AG: *Leben mit Lymphom, Information über Lymphomen und CLL*, URL: <https://www.leben-mit-lymphom.de/cll/krankheitsbild/vorkommen-bedeutung/>

URL 3 (14.04.2016) DP-Medsystems AG, Dr. Michael Kübrich: *NHL Info, Chronisch lymphatische Leukämie*, URL:
http://www.nhlinfo.de/exec/start?site=/chronisch_lymphatische_leukaemie/chronisch_lymphatische_leukaemie.htm&check=0

URL 4 (16.05.2016) 2016 Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.: *Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)*, URL:
<https://www.onkopedia.com/de/my-onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@view/html/index.html>

URL 5 (14.05.2016) Abbildung 1: *von CLL betroffene Zellen*, URL:
<https://blog.lecturio.de/wp-content/uploads/2015/12/von-CLL-betroffene-zellen.png>

URL 6 (14.05.2016) Abbildung 2: *Blutausstrich CLL*, URL: <http://www.lebenswegeforum.de/tumor-info/lymphome-leukaemien/chronisch-lymphatische-leukaemie.html>

URL 7 (20.05.2016) Univ.-Prof. Dr. Christa Fonatsch: *Zytogenetik bei malignen hämatopoetischen Erkrankungen*, URL:
<http://haematologieonkologie.universimed.com/artikel/zytogenetik-bei-malignen-h%C3%A4matopoietischen-erkrankungen>

URL 8 (25.05.2016) Roche Pharma AG: *Leben mit Lymphom, Information über Lymphomen und CLL*, URL: <https://www.leben-mit-lymphom.de/cll/behandlung/allgemein/>

URL 9 (06.06.2016) Zentrum für Diagnostik GmbH am Klinikum Chemnitz: *Unternehmen, Über uns*, URL: <http://www.laborchemnitz.de/unternehmen/ueber-uns.html>

URL 10 (06.06.2016) Zentrum für Diagnostik GmbH am Klinikum Chemnitz: *Fachbereiche/Abteilungen, Humangenetik*, URL: <http://www.laborchemnitz.de/fachbereiche-abteilungen/humangenetik.html>

URL 11 (20.07.2016) Kornschnabel, Manuela : *Einfluss der Stimulation mit CpG-Oligodesoxynukleotiden und Kostimulation mit CpG-Desoxynukleotiden und IL-2 auf Proliferation, Zytokinproduktion und Expression von Oberflächenmolekülen bei B-CLL-Zellen* , URL: <https://mediatum.ub.tum.de/?id=>

URL 12 (21.09.2016) Sandra von dem Hagen et al: *Krebs: Gutartige Tumoren*, URL: <http://www.onmeda.de/krankheiten/krebs-definition-gutartige-tumoren-1416-5>.

URL 13 (21.09.2016) Dr. med. Norbert Ostendorf: *Kernschatten*, URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Kernschatten>

Bücher :

Boveri T (1914): *Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren*. Fischer-Verlag, Jena, Germany, 22

Fuchs R., Steib P., Brümmendorf T. (2013): *Manual Hämatologie*, Nora-Verlag, 23. Auflage, S.72 ,78

Huber H., Löffler H., Faber V.: *Methoden der diagnostischen Hämatologie*. Springer-Verlag, Seite 105-110

Unterlagen aus dem Labor :

Zytogenetische Analyse KM, Blut.doc der Zentrum für Diagnostik

Zeitschriftenartikel:

Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson L, Lerner S, Keating MJ. *Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine*.

Ann Intern Med 1998; 129: 559-566

Buhmann R, Kurzeder C, Rehlau J, Westhaus D, Bursch S, Hiddemann W et al. *CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells*. Br J Haematol 2002; 118: 968–975.

Bosch F, Perales M, Cobo F. et al . *Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone (FMC) therapy in resistant or relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL) or follicular lymphoma (FL)* abstr. Blood. 1997; 90 2360 (Suppl 1))

Byrd J C, Rai K R, Sausville E A, Grever M. *Old and new therapies in chronic lymphocytic leukemia*. Semin Oncol. 1998; 25 65-74

CLL trialists' collaborative group . *Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia*. J Natl Cancer Inst. 1999; 91 861-868

Cooperative group for the study of Immunoglobulin in chronic lymphocytic leukemia. *Intravenous immunoglobulin for the prevention of infection in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med 1988; 319: 902-907

Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, Dechow T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C (2000a): *Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional highaffinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype*. Exp Hematol 28, 558-568

Decker T, Schneller F, Hipp S, Miething C, Jahn T, Duyster J, Peschel C (2002): *Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclinD2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27*. Leukemia 16, 327–334

Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C (2006): *Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression*. Blood 108, 3152-3160

Diehl L F, Ketchum L H. *Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia*. Semin Oncol. 1998; 25 80-97

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krohmer A, Bullinger L et al. *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med 2000; 343: 1910–1916.

Gahrton G, Robert KH, Friberg K, Zech L, Bird AG. *Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation*. Blood 1980; 56: 640–647. 4

Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T (2007): *Comprehensive genetic characterization of CLL: a study of 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVH status and immunophenotyping*. Leukemia 21,
Han T. et al. : *Chlorambucil vs combined chlorambucil-corticosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia*.
Cancer 1973; 31: 502-508

Hallek M. , B. Schmitt , B. Emmerich , H. Stein : *Chronische lymphatische Leukämie - Teil 2: Therapie*
Chronic lymphocytic leukemia - Part 2: Treatment

Harder S, Siebert R, Grote W, Schlegelberger S (1998): *Bedeutung genetischer Aberrationen für die histopathologische und klinisch-prognostische Klassifikation maligner Lymphome*. Medgen 10, 307-309

Johnson S, Smith AG, Löffler H. French Cooperative Group on CLL.
Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicine, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukemia.
Lancet 1996; 347: 1432-1438

Juliussen G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ et al. *Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities*. N Engl J Med 1990; 323: 720–724.

Krieg AM, Kline JN (2000): *Immune effects and therapeutic applications of CpG motifs in bacterial DNA*. Immunopharmacology 48, 303-305

Leporrier M, Chevret S, Cazin B. et al.
Randomized comparison of fludarabine, CAP and ChOP, in 695 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients.
Blood 1997; 90: 529a (Suppl 1))

Liang H, Nishiooka Y, Reich CF, Pisetsky DS, Lipsky PE (1996): *Activation of human B-cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides*. J Clin Invest 98, 1119-1129

Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner CM (2006): *Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. Blood 107, 742-751

- Michallet M, Archimboud E, Bandini G. et al.
HLA-identical sibling bone marrow transplantation in younger patients with chronic lymphocytic leukemia. , Ann Intern Med 1996; 124: 311-315
- Molica S.
Progression and survival studies in early chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1991; 78: 895-899
- O'Brien S, del Giglio A, Keating M.
Advances in the Biology and Treatment of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia.
Blood 1995; 85: 307-318
- Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, Pangalis GA, Bastion Y, Catovsky D, Mellstedt H.
Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leucemia.
J Clin Oncol 1997; 15: 1567-1574
- Reddy KS. *Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel.* Br J Haematol 2006; 132: 705–722. 25
- Rondelli D. et al. *2-Chlordeoxyadenosine in the treatment of relapsed/refractory chronic lymphocytic disorders.*
Eur J Hematol 1997; 58: 46-50
- Rozman C, Montserrat E (1995): *Chronic lymphocytic leukemia.* N Engl J Med 333, 1052-1057
- Sawitsky A, Rai KR, Glidewell O, Silver RT.
Comparison of daily versus intermittent chlorambucil and prednisone therapy in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1977; 50: 1049-1059
- Seymour JF. et al. *Survival of young patients with chronic lymphocytic leukemia failing fludarabine therapy.*
Leuk Lymphoma 1995; 18: 493-496
- Stilgenbauer S, Dohner K, Bentz M, Lichter P, Dohner H. *Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia.* Ann Hematol 1998; 76: 101–110.
- Vrobllová V, Smolej L, Vrbacky F, Jankovic čová K, Hrudková M, Malý J, Krejsek J (2009): *Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia.* Acta Medica 52, 3-
- Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S: *From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia.* Nat Rev Cancer 2010; 10: 37-50

Waselenko JK, Flynn JM, Byrd JC. *Stem-cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia.* , Semin Oncol 1999; 26: 48-61

Anhang

Anhang 1 – untersuchte Fälle mit zu wenig auswertbaren Karyogrammen für einen eindeutigen Befund oder einfachen Monosomien

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: [REDACTED]
Geburtsdatum: 06.04.52
Benutzer: , KN

Patientennummer: B-CLL
Fallnummer: K049216
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

19 19 19

Anzahl der Karyogramme:

19

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24TH~A 1		001	1	x	2228/-13448	44,XX,-13,-21	CID:42
24TH~A 1		002	1	x	9736/-1584	46,XX	CID:106
24TH~A 1		004	1	x	8810/14633	46,XX	CID:211
24TH~A 1		005	1	x	-4775/15812	46,XX	CID:213
24TH~A 2		007	1	x	-5248/-14433	46,XX	CID:16
24TH~A 2		009	1	x	-7603/-145	46,XX	CID:80
24TH~A 2		010	1	x	-6485/1340	41,XX,-2,-3,-8,-19,-22	CID:86
24TH~A 2		012	1	x	-833/6198	45,XX,-19	CID:114
24TH~A 2		013	1	x	6518/11523	46,XX	CID:136
24TH~A 2		014	1	x	-6375/14035	46,XX	CID:160
48TH~A 3		016	1	x	-9896/-10071	46,XX	CID:30
48TH~A 3		017	1	x	-147/-3951	46,XX	CID:55
48TH~A 3		018	1	x	-5108/4059	45,XX,-16	CID:72
48TH~A 3		019	1	x	3315/12091	44,XX,-8,-10	CID:82
48TH~A 3		020	1	x	5523/14639	46,XX	CID:91
48TH~A 4		021	1	x	5227/-9528	46,XX	CID:20
48TH~A 4		022	1	x	273/35	46,XX	CID:37
48TH~A 4		023	1	x	468/11817	46,XX	CID:65
48TH~A 4		024	1	x	8346/13948	46,XX	CID:68

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: [REDACTED]
Geburtsdatum: 27.07.37
Benutzer: , LEO

Patientennummer: 8-CLL
Fallnummer: K092316
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

3 3 3

Anzahl der Karyogramme:

3

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24MTX~1		001	1	x	4225/1509	46,XY	CID:6
72Th~A 6		005	1	x	7583/-984	? 46,XY,-7,+14	CID:47

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: [REDACTED]
Geburtsdatum: 20.11.38
Benutzer: , LEO

Patientennummer: BCLL
Fallnummer: L075716
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

3 3 3

Anzahl der Karyogramme:

3

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
48TH~A 4		002	1	x	6531/6492	? 46,XY	CID:88
72TH~A 5		003	1	x	5841/-2077	46,XY	CID:137
72TH~A 6		004	1	x	-274/3402	45,X,-Y	CID:125

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: XXXXXXXXXX
Geburtsdatum: 14.04.42
Benutzer: , BER

Patientennummer: BCCL
Fallnummer: K056816
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

25 25 25

Anzahl der Karyogramme:

25

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24Th~A 1		001	1	x	-2120/-16915	46,XX	CID:34
24Th~A 1		003	1	x	-6948/-13870	46,XX	CID:83
24Th~A 1		004	1	x	-4321/-11704	46,XX	CID:132
24Th~A 1		005	1	x	-691/-8381	46,XX	CID:185
24Th~A 1		006	1	x	2653/-8015	46,XX	CID:196
24Th~A 1		007	1	x	-3534/-8335	46,XX	CID:202
24Th~A 1		008	1	x	7491/-3974	46,XX	CID:287
24Th~A 1		009	1	x	895/-2181	46,XX	CID:334
24Th~A 1		010	1	x	2445/1332	46,XX	CID:429
24Th~A 1		011	1	x	7711/4301	46,XX	CID:494
24Th~A 1		012	1	x	9309/6394	46,XX	CID:543
24Th~A 1		014	1	x	-8187/7597	46,XX	CID:581
24Th~A 1		015	1	x	9640/9906	46,XX	CID:620
24Th~A 2		016	1	x	-5093/-18847	46,XX	CID:19
24Th~A 2		017	1	x	6688/-12691	46,XX	CID:158
24Th~A 2		018	1	x	-3263/-285	46,XX	CID:450
24Th~A 2		019	1	x	73/1935	46,XX	CID:509
24Th~A 2		020	1	x	3590/14984	46,XX ?	CID:745
48Th~A 3		027	1	x	9244/-2244	44,X,-X,-12	CID:99
48Th~A 4		030	1	x	2032/-1968	46,XX	CID:102
48Th~A 4		032	1	x	-1064/-229	46,XX	CID:111
72Th~A 6		045	1	x	6625/-4047	46,XX	CID:78
72Th~A 6		046	1	x	9658/4224	44,XX,-16,-17	CID:117
72Th~A 6		047	1	x	-7943/8205	46,XX	CID:136
72Th~A 6		048	1	x	-2812/8541	46,XX	CID:139

Anhang 2 – weitere Auswertungslisten der übrigen untersuchten Fälle

Auswerteliste

**Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz**

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: XXXXXXXXXX
Geburtsdatum: 16.05.40
Benutzer: , HEN

Patientennummer: B-CLL, K6
Fallnummer: K074316
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

16 16 16

Anzahl der Karyogramme:

16

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24TH~A 2		002	1	x	-496/-15367	46,XY	CID:11
24TH~A 2		003	1	x	1415/-14256	46,XY,chr(10)	CID:15
24TH~A 2		004	1	x	-7617/-14079	46,XY	CID:16
24TH~A 2		005	1	x	9848/-6914	40,X,-Y,-2,-4,-7,-9,-10	CID:32
24TH~A 2		006	1	x	-9488/-6445	45,XY,-18	CID:35
24TH~A 2		007	1	x	6697/1053	38,X,-Y,chr(5),-7,-9,-10,-16,-18,-18,-21	CID:50
24TH~A 2		008	1	x	3311/6716	45,X,-Y,chr(10)	CID:59
24TH~A 2		009	1	x	9180/7548	45,X,-Y	CID:62
24TH~A 2		010	1	x	2406/11468	45,X,-Y	CID:66
24TH~A 2		011	1	x	7501/12367	46,XY,chr(10),del(13q)	CID:70
24TH~A 2		012	1	x	5370/12455	46,XY	CID:71
24TH~A 2		013	1	x	-9386/13256	39,-X,Y,-7,-11,-15,-15,-16,-18	CID:75
48TH~A 4		015	1	x	-4828/-19598	46,XY,del(13q)	CID:1
48TH~A 4		016	1	x	4557/1118	45,X,-Y	CID:11
72TH~A 5		018	1	x	-4296/13024	46,XY,del(11q)	CID:38
72TH~A 5		019	1	x	570/15715	45,X,-Y	CID:42

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: [REDACTED]
Geburtsdatum: 17.01.57
Benutzer: , LEO

Patientennummer: CLL
Fallnummer: K094516
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

29 23 23

Anzahl der Karyogramme:

23

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24Th~A 1		002	1		5912/-18450		
24Th~A 1		003	1	x	-8789/-17955	45,XX,-11,-19,+mar	CID:12 Leo nur Stichproben!
24Th~A 1		004	1	x	1012/-14118	46,XX	CID:23
24Th~A 1		005	1		-713/-14239		
24Th~A 1		006	1	x	-7501/-8580	46,XX	CID:38
24Th~A 1		007	1		-5574/-4042		
24Th~A 1		009	1	x	-1766/-957	44,XX,?del(6q),-19,-22	CID:100
24Th~A 1		010	1	x	4192/12163	46,XX	CID:174
24Th~A 1		011	1	x	3372/18290	46,XX	CID:208
48Th~A 4		012	1	x	-199/-19705	45,XX,-21	CID:4
48Th~A 4		014	1	x	-8487/-6910	46,XX	CID:55
48Th~A 4		015	1	x	6536/-6514	46,XX	CID:60
48Th~A 4		016	1	x	3630/1042	46,XX	CID:105
48Th~A 4		017	1	x	4998/5248	46,XX	CID:131
72Th~A 6		019	1	x	8633/-10707	46,XX	CID:8
72Th~A 6		021	1	x	-8644/15376	43,X,-X,-3,-12	CID:40
24Th~A 2		022	1		8198/-15234		
24Th~A 2		028	1	x	-3144/4741	46,XX	CID:62
24Th~A 2		031	1		7201/11476		
24Th~A 2		033	1		-1691/13127		
48Th~A 3		037	1	x	5139/-13679	46,XX	CID:53
48Th~A 3		039	1	x	4794/-1921	46,XX	CID:124
48Th~A 3		040	1	x	-7704/2305	46,XX	CID:166
48Th~A 3		041	1	x	3515/3804	46,XX	CID:181
48Th~A 3		042	1	x	2621/4893	46,XX	CID:190
48Th~A 3		043	1	x	5944/4880	44,XX,-8,-9	CID:192
48Th~A 3		044	1	x	-5695/7955	46,XX	CID:214
48Th~A 3		045	1	x	5205/12857	46,XX	CID:225

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: XXXXXXXXXX
Geburtsdatum: 01.02.59
Benutzer: , LEO

Patientennummer: B-CLL
Fallnummer: K095216
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

21 21 21

Anzahl der Karyogramme:

21

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24Th~A 1		001	1	x	312/-16801	46,XY	CID:39 Leo nur Stichproben!
24Th~A 1		002	1	x	2693/-7670	46,XY,?del(11q)	CID:182
24Th~A 1		005	1	x	-9232/6407	46,XY,?del(11q)	CID:363
24Th~A 1		008	1	x	6246/15774	46,XY	CID:467
24Th~A 1		009	1	x	496/16586	46,XY,?del(11q)	CID:473
24Th~A 2		012	1	x	9417/-10036	46,XY,?del(11)	CID:171
24Th~A 2		013	1	x	8666/-2144	46,XY	CID:293
48Th~A 3		018	1	x	-6866/-13166	46,XY	CID:16
48Th~A 4		019	1	x	9123/-4125	46,XY	CID:17
48Th~A 4		020	1	x	3467/99	46,XY	CID:21
48Th~A 4		021	1	x	-2303/4312	46,XY	CID:29
48Th~A 4		022	1	x	5125/12798	46,XY	CID:45
72Th~A 5		023	1	x	-7198/-11912	42,XY,-2,-5,-13,-18	CID:33
72Th~A 6		025	1	x	-6581/-19198	46,XY	CID:3
72Th~A 6		029	1	x	6530/6975	44,XY,-18,-21	CID:81
72Th~A 6		030	1	x	8966/7393	46,XY	CID:82
72Th~A 6		031	1	x	-6740/11966	46,XY	CID:109
72Th~A 6		032	1	x	-2592/11857	46,XY	CID:111
72Th~A 6		033	1	x	9001/17033	46,XY	CID:131
72Th~A 6		034	1	x	8486/16675	46,XY	CID:132
72Th~A 6		035	1	x	1486/17510	46,XY	CID:133

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: XXXXXXXXXX
Geburtsdatum: 01.07.41
Benutzer: , HEN

Patientennummer: B-CLL, I
Fallnummer: K092616
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

36 22 22

Anzahl der Karyogramme:

22

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
48Th~A 1		001	1	x	-8529/-19665	46,X,-X,+12	CID:3
48Th~A 1		002	1	x	1756/-15766	46,XX	CID:326
48Th~A 1		003	1	x	-5861/-10416	46,XX	CID:870
48Th~A 1		008	1		-1848/-5385		
48Th~A 1		011	1	x	1509/-3566	46,XX	CID:1516
48Th~A 1		013	1	x	-749/-2865	45,XX,-18	CID:1632
48Th~A 2		015	1		-1158/-17445		
48Th~A 2		016	1	x	-5450/-9068	46,XX	CID:494
48Th~A 2		017	1	x	3069/-7989	43,XX,+1,-2,-5,-9,-17	CID:540
48Th~A 2		018	1		7943/-5497		
48Th~A 2		019	1	x	7024/-4915	43,XX,-6,-10,-18	CID:630
48Th~A 2		020	1		7030/-3288		
48Th~A 2		021	1	x	4116/-3368	44,XX,-6,-16	CID:712
48Th~A 2		024	1	x	-5477/3355	46,XX	CID:1120
48Th~A 2		025	1	x	-8492/3882	47,XX,+20	CID:1190
48Th~A 2		027	1	x	-6925/7667	46,XX	CID:1412
48Th~A 2		028	1	x	3858/10074	46,XX	CID:1540
48Th~A 2		029	1	x	-5243/11880	46,XX	CID:1656
72Th~A 5		033	1		7559/-3531		
72Th~A 5		036	1		8638/718		
72Th~A 5		037	1		8002/705		
72Th~A 5		039	1	x	-8212/246	46,XX	CID:203
72Th~A 5		040	1		4812/1875		
72Th~A 5		041	1	x	-9473/1772	46,XX	CID:230
72Th~A 5		042	1		5493/3349		
72Th~A 5		043	1	x	9534/3815	46,XX	CID:257
72Th~A 5		045	1	x	-3658/15335	46,XX	CID:403
72Th~A 5		046	1	x	7396/16971	46,XX	CID:422

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: XXXXXXXXXX
Geburtsdatum: 01.05.23
Benutzer: , LEO

Patientennummer: CLL
Fallnummer: K071316
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

31 31 31

Anzahl der Karyogramme:

31

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24TH~A 1		001	1	x	8804/-3650	45,XY,-22	CID:24 Leo nur Stichproben
24TH~A 1		002	1	x	6455/1633	46,XY	CID:31
24TH~A 1		003	1	x	-8685/11489	46,XY	CID:42
24TH~A 1		004	1	x	-4827/18494	46,XY	CID:57
24TH~A 2		005	1	x	337/-19248	45,XY,-9	CID:2
24TH~A 2		006	1	x	9335/-16335	46,XY	CID:5
24TH~A 2		007	1	x	-4497/-15530	46,XY	CID:11
24TH~A 2		008	1	x	-4741/-11113	46,XY	CID:23
24TH~A 2		010	1	x	-2803/-8077	46,XY	CID:32
24TH~A 2		012	1	x	-2432/8938	46,XY	CID:80
48TH~A 3		016	1	x	-428/-17997	46,XY	CID:10
48TH~A 3		017	1	x	764/-17251	46,XY,del(4p)	CID:13
48TH~A 3		019	1	x	-6820/-14114	46,XY	CID:36
48TH~A 3		021	1	x	-1786/-13633	46,XY	CID:40
48TH~A 3		022	1	x	7479/-12119	46,XY	CID:49
48TH~A 3		024	1	x	-5622/-8270	42,XY,-10,-17,-18,-22	CID:97
48TH~A 3		025	1	x	9263/-7091	46,XY,del(4p)	CID:100
48TH~A 3		028	1	x	7378/-93	46,XY,del(17p)	CID:147
48TH~A 3		029	1	x	5547/1676	46,XY	CID:151
48TH~A 3		030	1	x	-9491/9822	46,XY	CID:202
48TH~A 4		035	1	x	4052/-16643	46,XY	CID:10
48TH~A 4		051	1	x	8118/18589	43,X,-Y,-14,-22	CID:247
48TH~A 4		052	1	x	-2755/18704	46,XY	CID:251
72TH~A 5		056	1	x	-97/-8019	46,XY	CID:473
72TH~A 5		057	1	x	-2847/-8205	46,XY	CID:481
72TH~A 5		058	1	x	-8964/-6220	46,XY	CID:545

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: XXXXXXXXXX
Geburtsdatum: 25.02.53
Benutzer: , LEO

Patientennummer: B-CLL, K1
Fallnummer: L060816
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

10 10 10


Anzahl der Karyogramme:

10

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
48TH~A 3		001	1	x	6583/-19150	45,XX,der(11q),del(13q),-21	CID:6
48TH~A 3		003	1	x	8673/-1817	45,XX,der(11q),del(13q),-21	CID:19
48TH~A 3		005	1	x	-9835/219	37,XX,-5,-9,-10,der(11)t(11;21),del(13q),-13,-21,-22	CID:22
48TH~A 3		006	1	x	-9221/2311	45,XX,der(11q),del(13q),-21	CID:24
48TH~A 3		008	1	x	9805/10774	38,XX,7der(5)t(5;13),-8,-9,-10,-11,-13,del(13q),-18,-21	CID:31
48TH~A 4		010	1	x	1913/-11362	45,XX,der(11)t(11;21),del(13q),-21	CID:3
48TH~A 4		012	1	x	-7668/2894	45,XX,der(11q),del(13q),-21	CID:13
48TH~A 4		013	1	x	-7920/12287	45,XX,der(11q),-13,7+15,-21	CID:16
72TH~A 5		018	1	x	-6177/-5028	45,XX,der(11q),del(13q),-21	CID:13
72TH~A 6		025	1	x	4132/10459	45,XX,der(11q),del(13q),-21	CID:35

Auswerteliste**Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz**

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
 Phone: +49 (0) 371 333-22220
 Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: 
 Geburtsdatum: 18.05.53
 Benutzer: , HEN

Patientennummer: B-CLL, K9
 Fallnummer: K085716
 Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert): 25 22 22
 Anzahl der Karyogramme: 22

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24TH~A 2	019	1			-6260/-12364		
24TH~A 2	020	1	x		363/-9438	40,XX,-9,-10,-16,-17,-20,-21	CID:74
24TH~A 2	021	1	x		-1720/-2890	46,XX	CID:131
24TH~A 2	022	1	x		-8927/-2351	46,XX	CID:134
24TH~A 2	023	1	x		-4541/-2508	46,XX	CID:135
24TH~A 2	024	1	x		-8698/-2212	43,XX,-10,-13,-21	CID:146
24TH~A 2	025	1	x		8534/-704	43,XX,-18,-18,-20	CID:149
24TH~A 2	027	1	x		3226/-972	46,XX	CID:154
24TH~A 2	028	1			-9519/-929		
24TH~A 2	031	1	x		8179/5636	45,XX,-10	CID:222
24TH~A 2	032	1	x		9646/8002	45,XX,-19	CID:257
24TH~A 2	033	1	x		-1853/8650	46,XX	CID:264
24TH~A 2	034	1	x		-1371/9126	46,XX	CID:276
24TH~A 2	035	1	x		-8936/9052	46,XX	CID:280
24TH~A 2	036	1	x		-4072/11292	41,XX,-3,-4,-8,-14,-20	CID:301
24TH~A 2	037	1	x		-4481/14437	46,XX	CID:319
24TH~A 2	038	1			514/16417		CID:331
24TH~A 2	039	1	x		7141/19410	46,XX,chr(10)	CID:356
48TH~A 3	040	1	x		-5199/-9860	46,XX	CID:48
48TH~A 3	042	1	x		-5775/8458	46,XX	CID:213
48TH~A 3	043	1	x		1630/16394	46,XX	CID:277
48TH~A 4	045	1	x		-9746/-8628	46,XX	CID:83
48TH~A 4	046	1	x		-5433/-8343	46,XX	CID:89
72TH~A 5	050	1	x		2457/13961	46,XX	CID:55
72TH~A 6	052	1	x		-662/4969	46,XX	CID:31

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: XXXXXXXXXX
Geburtsdatum: 18.06.51
Benutzer: , LEO

Patientennummer: CLL/NHL
Fallnummer: K066916
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

23 23 23

Anzahl der Karyogramme:

23

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24TH~A 1	001	1	x	9200/-13406	46,XX		CID:5 Leo nur Stichproben
24TH~A 1	003	1	x	-4580/4194	45,XX,-20		CID:49
24TH~A 1	004	1	x	4494/8142	42,XX,-1,-3,-18,-20		CID:57
24TH~A 1	006	1	x	3707/15909	46,XX		CID:87
24TH~A 2	012	1	x	207/11838	46,XX		CID:70
24TH~A 2	013	1	x	-5948/12764	46,XX		CID:72
24TH~A 2	014	1	x	5496/15074	45,XX,-10		CID:78
72TH~A 6	042	1	x	698/4345	45,XX,-6,del(8q),der(18q)		CID:845
72TH~A 6	046	1	x	-4/10001	46,XX		CID:1096
72TH~A 6	049	1	x	-5829/13122	46,XX		CID:1237
48TH~A 8	080	1	x	761/-15435	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:443
48TH~A 8	081	1	x	-681/-15669	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:444
48TH~A 8	082	1	x	-8221/-15250	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:457
48TH~A 8	083	1	x	308/-14448	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:482
48TH~A 8	084	1	x	-1537/-14170	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:522
48TH~A 8	087	1	x	-1613/-11033	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:755
48TH~A 8	088	1	x	-219/-10272	46,XX		CID:826
48TH~A 8	090	1	x	6812/-9165	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:918
48TH~A 8	092	1	x	5399/-8017	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:1063
48TH~A 8	093	1	x	4222/-7897	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:1069
48TH~A 8	095	1	x	4043/-7206	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:1158
48TH~A 8	097	1	x	-8576/-6803	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:1311
72TH~A 10	106	1	x	-2445/5346	46,XX,del(8q),der(18q)		CID:302

Auswerteliste

**Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz**

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: [REDACTED]
Geburtsdatum: 06.06.42
Benutzer: , LEO

Patientennummer: BCLL
Fallnummer: L058116
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

23 23 23

Anzahl der Karyogramme:

23

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
48TH~A 3		002	1	x	-6706/836	46,XY,?del(20q)	CID:40 Leo nur Stichproben
48TH~A 4		004	1	x	-141/-8618	46,XY,der(1)t(1;1),der(1)t(1;1)del(1q)	CID:14
48TH~A 4		005	1	x	-3100/-5485	46,XY,der(1)t(1;1),der(1)t(1;1)del(1q)	CID:19
48TH~A 4		006	1	x	164/-4834	46,XY,der(1)t(1;1),der(1)t(1;1)del(1q)	CID:20
48TH~A 4		007	1	x	-424/-3627	46,XY	CID:22
48TH~A 4		008	1	x	5309/-2857	46,XY	CID:24
48TH~A 4		009	1	x	-8298/-349	46,XY	CID:26
48TH~A 4		011	1	x	3247/13627	46,XY,del(11q)	CID:38
48TH~A 4		012	1	x	3933/14455	46,XY	CID:39
72TH~A 5		013	1	x	947/-18162	46,XY,der(1)t(1;1),der(1)t(1;1)del(1q)	CID:3
72TH~A 5		014	1	x	8184/-16542	46,XY,der(1)t(1;1),der(1)t(1;1)del(1q)	CID:10
72TH~A 5		015	1	x	-1744/-15472	46,XY	CID:18
72TH~A 5		017	1	x	5837/-7664	46,XY	CID:59
72TH~A 5		018	1	x	2693/13705	46,XY,der(1)t(1;1),der(1)t(1;1)del(1q)	CID:176
72TH~A 5		019	1	x	-3296/13944	46,XY	CID:177
72TH~A 6		020	1	x	1844/-15069	46,XY	CID:11
72TH~A 6		021	1	x	-298/-9172	45,XY,?der(1q),-22	CID:39
72TH~A 6		022	1	x	2578/724	46,XY	CID:92
72TH~A 6		023	1	x	-7928/914	46,XY	CID:93
72TH~A 6		024	1	x	163/6401	46,XY,der(20)t(7;20)	CID:119
72TH~A 6		025	1	x	995/8511	46,XY,t(11;17)	CID:129
72TH~A 6		026	1	x	-713/8916	46,XY,der(1)t(1;1),der(1)t(1;1)del(1q)	CID:133
72TH~A 6		027	1	x	2078/11956	46,XY	CID:147

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: 
Geburtsdatum: 22.10.43
Benutzer: , LEO

Patientennummer: B-CLL, I
Fallnummer: K093916
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

24 24 24

Anzahl der Karyogramme:

24

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24Th~A 2	008	1	x	-3090/-8083	44,XY,-2,-11	CID:20	Leo nur Stichproben!
24Th~A 2	009	1	x	-1090/-2979	46,XY	CID:32	
24Th~A 2	011	1	x	-8572/1497	46,XY	CID:45	
24Th~A 2	014	1	x	7755/9496	45,XY,-21	CID:56	
24Th~A 2	015	1	x	-7042/11331	46,XY	CID:59	
48Th~A 3	017	1	x	2432/-12315	46,XY	CID:16	
48Th~A 3	018	1	x	2707/-6356	46,XY	CID:30	
48Th~A 3	021	1	x	4434/9384	46,XY	CID:76	
48Th~A 4	024	1	x	-3055/-10142	46,XY	CID:31	
48Th~A 4	025	1	x	-7793/-5338	45,XY,-10	CID:58	
48Th~A 4	026	1	x	7998/1022	45,XY,-9	CID:89	
48Th~A 4	032	1	x	3987/11619	46,XY	CID:142	
48Th~A 4	033	1	x	-5158/11547	46,XY	CID:145	
48Th~A 4	035	1	x	-3812/15632	46,XY	CID:162	
72Th~A 5	046	1	x	1372/-11277	46,XY,del(11q)	CID:184	
72Th~A 5	057	1	x	4686/282	46,XY,del(11q)	CID:529	
72Th~A 5	067	1	x	641/4818	46,XY,del(11q)	CID:657	
72Th~A 6	080	1	x	-556/-16986	46,XY	CID:12	
72Th~A 6	082	1	x	824/-16412	46,XY	CID:20	
72Th~A 6	083	1	x	-275/-16853	46,XY,del(11q)	CID:22	
72Th~A 6	096	1	x	9172/-1452	46,XY	CID:266	
72Th~A 6	098	1	x	3429/1467	46,XY	CID:337	
72Th~A 6	104	1	x	-611/4345	46,XY,del(11q)	CID:432	
72Th~A 6	128	1	x	-7218/14378	46,XY,del(11q),der(5q)?	CID:799	

Auswerteliste**Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz**

Flemmingstraße 2
 09116 Chemnitz
 Phone: +49 (0) 371 333-22220
 Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: XXXXXXXXXX
 Geburtsdatum: 27.03.42
 Benutzer: , HEN

Patientennummer: B-CLL, K1
 Fallnummer: L068616
 Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert): 24 22 22
 Anzahl der Karyogramme: 22

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
48TH~A 3	012	1	x	6775/-14807	46,XX,der(4),del(11q)	CID:945	Leo nur Stichprobe
48TH~A 3	020	1		3600/-10069			
48TH~A 3	021	1	x	-7634/-8736	46,XX	CID:1693	
48TH~A 4	023	1		2970/-18656			
48TH~A 4	024	1	x	4039/-16754	47,XX,+7der(21)	CID:75	
48TH~A 4	025	1	x	-1162/-16305	46,XX	CID:91	
48TH~A 4	028	1	x	-1718/-15329	46,XX	CID:165	
48TH~A 4	030	1	x	4073/-11293	46,XX	CID:381	
48TH~A 4	031	1	x	-3186/-10179	47,XX,+6	CID:426	
48TH~A 4	034	1	x	2587/-7617	44,XX,-13,-21	CID:626	
48TH~A 4	037	1	x	-2540/-5721	45,XX,-15	CID:782	
48TH~A 4	038	1	x	-9370/-5850	46,XX	CID:794	
48TH~A 4	039	1	x	-9267/-4893	46,XX	CID:799	
48TH~A 4	040	1	x	-9077/-4834	46,XX	CID:800	
48TH~A 4	041	1	x	-6719/-2793	46,XX	CID:940	
48TH~A 4	043	1	x	599/-105	46,XX	CID:1072	
48TH~A 4	044	1	x	-4712/393	46,XX	CID:1089	
48TH~A 4	047	1	x	379/6174	46,XX,der(4),del(11q)	CID:1336	
48TH~A 4	049	1	x	1818/8113	46,XX	CID:1459	
48TH~A 4	050	1	x	-3349/7674	46,XX	CID:1477	
48TH~A 4	051	1	x	427/9575	45,XX,-20	CID:1564	
72TH~A 5	054	1	x	-1494/-412	45,XX,der(4),?t(6;8),del(11q),-15	CID:27	
72TH~A 6	055	1	x	5672/14154	46,XX,der(4),del(11q)	CID:88	
72TH~A 6	056	1	x	-2901/18606	46,XX	CID:108	

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: [REDACTED]
Geburtsdatum: 19.07.36
Benutzer: , LEO

Patientennummer: BCLL K4
Fallnummer: K064516
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert):

22 22 22

Anzahl der Karyogramme:

22

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
24TH~A 1		002	1	x	7713/-8782	46,XY	CID:12 Leo nur Stichproben
24TH~A 1		003	1	x	6836/-3968	46,XY	CID:20
24TH~A 1		004	1	x	8497/-3801	45,... Klon II	CID:21
24TH~A 1		005	1	x	6977/19657	46,XY	CID:45
24TH~A 2		006	1	x	-733/-14516	43,X,-Y,-3,-7	CID:7
24TH~A 2		007	1	x	-1273/-10550	46,XY	CID:12
24TH~A 2		008	1	x	3298/-9357	46,XY	CID:13
24TH~A 2		009	1	x	-3827/-2744	46,XY	CID:23
24TH~A 2		010	1	x	8017/-2201	46,XY	CID:25
24TH~A 2		011	1	x	83/-599	46,XY	CID:28
24TH~A 2		012	1	x	-1438/4435	45,XY,-21	CID:39
24TH~A 2		015	1	x	-94/7490	46,XY	CID:50
48TH~A 3		022	1	x	-3417/-1331	45,XY,-1,der(13),der(17)	CID:34
48TH~A 3		023	1	x	-6973/9209	45,... Klon I	CID:42
72TH~A 5		025	1	x	8425/11758	? 45,... Klon I	CID:106
72TH~A 5		026	1	x	7353/16165	45,... Klon I	CID:126
72TH~A 5		027	1	x	-1679/17875	? 45,... Klon I	CID:135
72TH~A 6		028	1	x	6677/-8411	45,... Klon I	CID:28
72TH~A 6		029	1	x	9147/-8028	45,... Klon I	CID:29
72TH~A 6		031	1	x	9838/-2575	45,... Klon I	CID:47
72TH~A 6		032	1	x	5787/1344	45,... Klon II	CID:57
72TH~A 6		033	1	x	-4192/4457	45,... Klon I	CID:65

Auswerteliste

Zentrum für Diagnostik
am Klinikum Chemnitz

Flemmingstraße 2
09116 Chemnitz
Phone: +49 (0) 371 333-22220
Fax: +49 (0) 371 333-22101

Name: 
Geburtsdatum: 18.01.53
Benutzer: , LEO

Patientennummer: B-CLL I
Fallnummer: L051316
Datum: 08.09.16

Anzahl der Metaphasen (gesamt, gezählt, analysiert): 25 23 23
Anzahl der Karyogramme: 23

Kult.	OT	Bild	Felder	Karyo.	Koordinaten	Karyotyp	Bemerkungen
48Th~A 3		001	1	x	3532/11214	42,X,-X,-6,-13,-18	CID:16 Leo nur Stichproben
72Th~A 4		002	1	x	-1698/-18614	45,X,-X	CID:14
72Th~A 4		004	1	x	-9646/-14936	42,XX,-9,-18,-19,-20	CID:58
72Th~A 4		010	1		-6478/-8903		
72Th~A 4		013	1	x	1501/-7008	46,XX	CID:199
72Th~A 4		014	1		-5847/-6343		
72Th~A 4		017	1	x	-1075/-5267	46,XX	CID:235
72Th~A 4		019	1	x	-7044/-4094	46,XX	CID:248
72Th~A 4		024	1	x	-2367/595	45,X,-X,?del(7q),-20,?der(21q),+mar	CID:330
72Th~A 4		025	1	x	-1905/1256	46,XX	CID:340
72Th~A 4		026	1	x	2039/2462	44,XX,-3,-16	CID:367
72Th~A 4		027	1	x	-6969/7685	46,XX	CID:446
72Th~A 4		028	1	x	-1996/9453	46,XX	CID:461
72Th~A 4		029	1	x	7275/9818	46,XX	CID:462
72Th~A 4		030	1	x	6515/11428	46,XX	CID:482
72Th~A 5		032	1	x	-4788/-11096	45,XX,-2	CID:108
72Th~A 5		033	1	x	6110/-10281	46,XX	CID:120
72Th~A 5		035	1	x	-2099/-2021	45,XX,-17	CID:244
72Th~A 5		036	1	x	8751/778	46,XX	CID:276
72Th~A 5		037	1	x	4336/282	46,XX	CID:278
72Th~A 5		038	1	x	7452/1047	46,XX	CID:286
72Th~A 5		039	1	x	-322/2370	45,XX,-11	CID:304
72Th~A 5		040	1	x	4271/2152	46,X,-X,+mar	CID:306
72Th~A 5		043	1	x	-4614/8516	46,XX	CID:407
72Th~A 5		044	1	x	4231/8576	46,XX	CID:411

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 25. September 2016

Naumann Michelle